F 1330

studii şi cercetări de biochimie

1

TOMUL 16

1973

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 16, nr. 1, p. 1—114, Bucureşti, martie 1973

SCBIAS — 16 (1), 1—114 (1973)

COMITETUL DE REDACŢIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUŞANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU, I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacţie:

VICTOR GHEŢIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Preţul unui abonament anual este de 80 lei.

În ţară abonamentele se fac la oficiile poştale, agenţiile poştale, factorii poştali şi difuzorii voluntari din întreprinderi şi instituţii. Revistele se pot procura (direct sau prin poştă) şi prin PUNCTUL DE DESFACERE din cadrul EDITURII ACADEMIEI.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se fac prin Întreprinderea Rompresfilatelia, Căsuţa poştală 2001 — telex 011631, Bucureşti, România, sau prin reprezentanţii săi din străinătate.

Manuscrisele, cărţile şi revistele pentru schimb, precum şi orice corespondenţă se vor trimite pe adresa comitetului de redacţie al revistei „Studii şi cercetări de biochimie", Bucureşti, str. Docenţilor, nr. 20, sectorul 1.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
Bucureşti, str. GUTENBERG nr. 3 bis, sectorul 6

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
B I O C H I M I E

Tomul 16, nr. 1 1973

MŰSZAKI KÖNYVTÁR

SUMAR

Pag.

Z. ANCA, Acţiunea ionilor de cadmiu asupra unor sisteme de dehidrogenare pe rinichi izolat şi perfuzat la şobolan 5

O. DREICHLINGER şi G. DEUTSCH, Acţiunea unor compuşi acilaţi ai acidului p-aminohipuric asupra metabolismului energetic şi transportul acidului p-aminohipuric în ţesutul renal *in vitro* 9

I. HURGHIŞIU, Cercetări comparative asupra aminoacizilor liberi din *Phragmites australis* (Cav.) Trin. et Stend., *Typha angustifolia* L., *Typha latifolia* L. şi *Scirpus lacustris* L. 17

V. JURCĂ şi A. REUS, Izoperoxidazele din frunzele de tomate infestate cu musculiţa albă de seră (*Trialeurodes vaporariorum* Westw.) înainte şi după combaterea acesteia cu insecticide 23

V. JURCĂ, G. CAZACU şi C. CAZACU, Electroforeza în gel de poliacrilamidă a proteinelor în embriogeneză la *Cyprinus carpio*, *Hypophthalmichthys molitrix* şi *Ctenopharingodon idella* 29

G. NEAMŢU şi C. BODEA, Contribuţii la biosinteza carotenoidelor. V. Biosinteza carotenoidelor din *Aesculus rubicunda* Auct. 35

R. OLINESCU, S. NIŢĂ, M. MUNŢIU şi L. COSTEA, Hiperamilazemie produsă în urma iradierii 45

L. SCOLNIC, Influenţa ionului de rubidiu asupra conţinutului şi exosmozei acidului lactic, precum şi a conţinutului în apă totală la muşchii sartorius şi gastrocnemieni de broască 53

H. D. SCHELL şi TR. BENŢIA, Interacţiunea proteinelor cerebrale cu unele săruri cuaternare de amoniu fluorescente derivate de la stilben 61

M. TĂMAŞ, Contribuţii la studiul chemotaxonomic al ord. *Ericales*. III. Flavonoidele 71

REFERAT GENERAL

M. ŞERBAN, Orientări şi tendinţe în enzimologia comparată 83

RECENZII 101

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

Tome 16, no. 1 1973

CONTENTS

Page

Z. ANCA, The action of cadmium ions on certain dehydrogenation systems in isolated and perfused rat kidneys 5

O. DREICHLINGER and G. DEUTSCH, *In vitro* effects of certain acylated compounds of p-aminohippuric acid on energy metabolism and p-aminohippurate transport in the rat kidney 9

I. HURGHIŞIU, Comparative investigations on amino acids from *Phragmites australis* (Cav.) Trin. et Stend., *Typha angustifolia* L., *Typha latifolia* L. and *Scirpus lacustris* L 17

V. JURCĂ and A. REUS, The iso-peroxidases in tomato leaves infested with greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorium* Westw.) before and after insecticide control 23

V. JURCĂ, G. CAZACU and C. CAZACU, Polyacrilamide gel electrophoresis of proteins during embriogenesis of *Cyprinus carpio*, *Hypophthalmichthys molitrix* and *Ctenopharyngodon idella*. 29

G. NEAMŢU and C. BODEA, On the biosynthesis of carotenoids. V. Biosynthesis of carotenoids in *Aesculus rubicunda* Auct. 35

R. OLINESCU, S. NIŢĂ, M. MUNŢIU and L. COSTEA, Radiation-induced hyperamylasemia 45

L. SCOLNIC, The effect of rubidium ions upon lactic acid and total water content as well as upon lactic acid exosmosis in sartorius and gastrocnemius frog muscles 53

H. D. SCHELL and TR. BENŢIA, Interaction of brain proteins with some fluorescent ammonium quaternary salts derived from stilbene 61

M. TĂMAŞ, Contributions to the chemotaxonomic study of *Ericales*. III. Flavonoids 71

REVIEW

M. ŞERBAN, Directions and purposes in comparative enzymology 83

BOOK REVIEW 101

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 1, 5–8 (1973)

ACȚIUNEA IONILOR DE CADMIU ASUPRA UNOR SISTEME DE DEHIDROGENARE PE RINICHI IZOLAT ȘI PERFUZAT LA ȘOBOLAN

ZOE ANCA

Rezumat. — S-a studiat acțiunea cadmiului *in vitro* asupra unor sisteme de oxidoreducere din rinichiul de șobolan.

Ca substrate au fost folosite piruvatul, lactatul, citratul și succinatul.

Din datele obținute rezultă că ionul de cadmiu determină perturbări în procesele de oxidoreducere.

Cele mai sensibile sisteme enzimatice de oxidoreducere sînt cele NAD dependente.

Plecînd de la faptul binecunoscut că în cadrul efectelor sale citotoxice cadmiul poate provoca apariția unor leziuni renale [1] — [3], ne-am pus problema de a evidenția sistemele enzimatice prin a căror afectare ar avea loc acțiunea nocivă a cadmiului.

Majoritatea studiilor toxicologice se referă, cu prioritate, la efectul inhibitor al ionului de cadmiu asupra enzimelor tiolactive [2]—[5].

Există mai puține date referitoare la acțiunea acestui ion asupra metabolismului glucidic [4], [6], [7].

În lucrarea de față ne-am propus să urmărim pe cale experimentală activitatea mai multor sisteme enzimatice, la nivelul metabolismului glucidic, pe rinichi izolat de șobolan.

MATERIAL ȘI METODE

Experiențele s-au efectuat pe două loturi de șobolani albi, femele, în greutate de 160—180 g. S-a folosit preparatul de „rinichi izolat" și perfuzat cu soluție Ringer-Krebs cu adaos de clorură de cadmiu de 4 mg%. La lotul de animale martor s-a lucrat în condiții identice, cu excepția faptului că în soluția de perfuzie nu s-a adăugat clorură de cadmiu.

Pentru a asigura o presiune coloidosmotică corespunzătoare și pentru ca ionii de cadmiu să nu vină în contact direct cu celulele renale, în lichidul de perfuzie s-a adăugat ser sanguin în proporție de 5%. Avantajul adăugării de ser constă în faptul că ionii de cadmiu iau contact direct mai întîi cu proteinele serice. De asemenea prin componenții săi,

serul asigură o tamponare bună a lichidului de perfuzie. În cursul perfuziei, rinichii nu au prezentat fenomene de edem care obișnuit apar în cazul perfuziilor *in vitro* în absența serului.

Durata perfuziei a fost de 60 de minute, temperatura 37°C și presiunea 90 mm Hg.

Principiul metodei aplicate constă în reducerea enzimatică a 2, 3, 5-trifeniltetrazoliului în prezența diferitelor substrate și formarea de trifenilformazan derivat de culoare roșie, solubil în solvenți organici [5].

Metoda reflectă activitatea mai multor sisteme enzimatice de oxido-reducere. În consecință, hidrogenul ce se fixează pe tetrazoliu poate proveni din mai multe surse și poate fi transportat pe mai multe căi pînă la acceptorul final de hidrogen (vezi schema 1).

Substanțele folosite ca substrate au fost: piruvatul (în concentrație de 11,36 mM la litru), lactatul (11,11 mM la litru), citratul (0,521 mM la litru) și succinatul (8,47 mM la litru).

În principiu, metoda pe care am folosit-o constă în perfuzia rinichiului după tehnica următoare:

După anestezia animalului cu eter, se deschide cavitatea abdominală, se secționează artera aortă cît mai aproape de diafragmă, se înlătură partea anterioară a animalului, apoi se leagă artera aortă deasupra rinichilor. Este oportun să se aplice o legătură strînsă și asupra trunchiului celiac și mezenteric superior. Cu o sondă canelată se detașează ușor artera aortă cît mai jos de rinichi, se secționează vena cavă inferioară, iar printr-o breșă în artera aortă se introduce o canulă foarte subțire, care se leagă de aortă. Se atașează o siringă la canulă și se spală rinichiul de sînge cu soluția de perfuzat, se detașează apoi siringa de la canulă și se leagă canula la aparatul de perfuzie. Durata perfuziei a fost de 60 de minute; ritmul de perfuzie 0,8—1 ml de lichid de perfuzie pe minut.

După terminarea perfuziei s-a izolat rinichiul, s-a secționat o porțiune în jur de 100—120 mg, care apoi s-a triturat cu acetonă, în proporție de 6 ml la 100 mg țesut umed. Cantitatea de acetonă s-a adăugat fracționat, pentru a asigura o extracție totală, iar extractele acetonice unite s-au centrifugat și colorimetrat contra unei probe standard de formazan, la lungimea de undă de 493 nm [5].

Valorile obținute s-au exprimat în mg de tetrazoliu redus în 60 de minute de 100 mg țesut umed.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

După cum reiese din tabela 1, în cazul folosirii ca substrat a piruvatului, lactatului și citratului, la lotul de animale perfuzate cu clorură de cadmiu se observă o scădere semnificativă a ritmului de reducere a tetrazoliului, cu diferențe statistic semnificative între cele două loturi de animale ($p < 0,01$).

Folosind succinatul drept donator de hidrogen, între valorile obținute la cele două loturi de animale nu au fost găsite diferențe semnificative ($p > 0,1$).

Din datele prezentate reiese în mod evident că ionul de cadmiu este în stare să afecteze unele etape ale procesului de degradare a glucozei. În acest sens se remarcă îndeosebi efectul inhibitor asupra sistemului de

Tabela 1

Concentraţia 2,3,5-trifeniltetrazoliului redus din rinichiul de şobolan sub acţiunea ionului de cadmiu (mg/100 mg ţesut umed/60 de minute)
Valori medii

Substratul	Martor	Perfuzia cu $CdCl_2$	P
Piruvat	3,0 (6)	1,3 (5)	<0,01
Lactat	5,1 (5)	1,6 (6)	<0,01
Citrat	4,3 (6)	1,5 (5)	<0,01
Succinat	4,5 (4)	3,3 (4)	>0,1

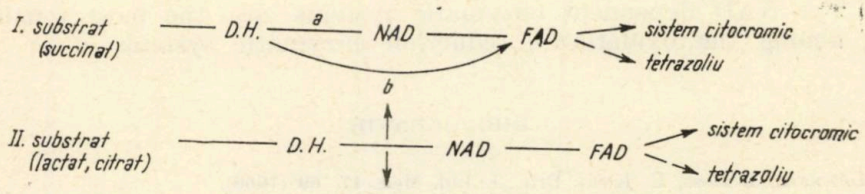
( ) = număr de animale

oxidoreducere, interesînd cuplul piruvat-lactat (lactat: NAD-oxidoreductază), precum şi sistemul enzimatic ce participă la dehidrogenarea citratului.

În schimb, sistemul succin-dehidrogenază (succinat FAD-oxidoreductază) nu este afectat sub acţiunea ionului de cadmiu.

Pentru înţelegerea semnificaţiei acestor deosebiri este util să reproducem lanţul reacţiilor în limitele cărora are loc oxidarea produşilor intermediari ai metabolismului glucidic, precum şi reducerea prin fixare de hidrogen de către moleculele de 2, 3, 5-trifeniltetrazoliu şi transformarea acestuia în produsul final redus formazan (schema 1).

SCHEMA 1.



Sursele şi căile de transport ale hidrogenului pînă la acceptorul final.

Comparînd cele două şiruri de reacţii, rezultă că ionul de cadmiu viciază acele sisteme de oxidoreducere care necesită ca transportor de hidrogen-NAD, în schimb nu afectează unele sisteme (succinat oxidoreductază) care nu sînt strict NAD dependente, care pot deci transfera hidrogenul direct pe FAD, fără a fi nevoie de NAD ca intermediar.

Pe baza acestor rezultate este necesar să observăm că în lichidul de perfuzie nu s-au adăugat cianuri pentru blocarea căii citocromilor. În aceste condiţii de lucru, putem admite că hidrogenul desprins de pe substrat este transferat numai parţial pe tetrazoliu, restul luînd calea

oxidativă a sistemului citocrom-citocromoxidază. Motivul pentru care nu am adăugat cianuri mediului de perfuzie este că nu am vrut să privăm celulele renale de aport energetic.

CONCLUZII

În cazul folosirii piruvatului, lactatului şi citratului ca substrat, proporţia de hidrogen dirijat spre tetrazoliu este mai scăzută în prezenţa ionilor de cadmiu, ceea ce ar fi o dovadă că ionul de cadmiu intervine ca element inhibitor în trecerea hidrogenului de pe substrat pe NAD.

Ionul de cadmiu afectează specific unele sisteme enzimatice de oxidoreducere, cele mai sensibile fiind cele NAD dependente.

Prezentat la redacţie la 25 aprilie 1972

Institutul de sănătate publică şi cercetări medicale
Cluj

THE ACTION OF CADMIUM IONS ON CERTAIN DEHYDROGENATION SYSTEMS IN ISOLATED AND PERFUSED RAT KIDNEYS

SUMMARY

The *in vitro* action of cadmium on certain oxidation — reduction systems, in rat kidneys, has been studied. Pyruvate, lactate, citrate, and succinate were used as substrates.

The obtained data show that cadmium ions induce alterations of the oxidation — reduction processes.

The NAD dependent enzymatic systems are the most sensitive ones among the oxidation — reduction enzymatic systems.

BIBLIOGRAFIE

1. I. Bonnell, I. Ross, E. King, Brit. J. Ind. Med. **17**, 69 (1969).
2. L. Dérobert, *Intoxications et maladies professionelles*. Ed. Flammarion, Paris, 1954, p. 506.
3. B. Axelsson, M. Piscator, Arch. Environin Health, **12**, 360 (1966).
4. F. Fabroni, Med. Lavoro, **56**, 58 (1965).
5. P. Georgescu, E. Păunescu, *Metode biochimice de diagnostic şi cercetare*, Edit. medicală, Bucureşti, 1960, p. 394.
6. S. Granata, M. Barbaro, L. Maturio, Arch. Mal. Prof., **31**, 357 (1970).
7. A. Sporn, A. Cîrstea, G. Ghizelea, I. Dinu, L. Boghianu, L. Ozeranschi., E. Botescu, Igiena, **19**, 729 (1970).
8. A. Sporn, I. Dinu, L. Stoenescu, Igiena, **19**, 201 (1970).

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 1, 9–15 (1973)

ACȚIUNEA UNOR COMPUȘI ACILAȚI AI ACIDULUI p-AMINOHIPURIC ASUPRA METABOLISMULUI ENERGETIC ȘI TRANSPORTUL ACIDULUI p-AMINOHIPURIC ÎN ȚESUTUL RENAL *IN VITRO*

O. DREICHLINGER și G. DEUTSCH

Rezumat. — Se testează acțiunea unor compuși acilați noi din seria acidului p-aminohipuric (PAH) asupra consumului de O_2, producției de CO_2, coeficientului respirator și asupra prelucrării unor substanțe energetice (glucoză și acidul lactic) pe un preparat tisular constituit din tuburi renale izolate și pe felii de rinichi de șobolan.

Se studiază influența compușilor sintetizați asupra transportului PAH și, pe baza rezultatelor obținute, se interpretează mecanismele metabolice ce pot interveni în acest transport, precum și relațiile acestuia cu transportul acizilor grași.

Într-o lucrare anterioară [1] am evidențiat că oxidarea renală a lipidelor, oferite sub forma acizilor grași liberi (care reprezintă substratul preferat al oxidării celulare în rinichi [2] — [4]), este stînjenită de prezența acidului p-aminohipuric (PAH). Se știe,pe de altă parte, că acizii grași exercită o acțiune de inhibare a transportului PAH, acțiune suspendată în prezență de acetat [5]. Aceste fapte s-ar putea explica admițînd formarea unor molecule de tip acil-PAH, care ar acționa inhibitor atît asupra transportului celular al acizilor grași, cît și asupra transportului PAH.

O cale pentru verificarea acestei ipoteze constă în sinteza unor substanțe de tip acil-PAH și în studierea acțiunii acestora asupra schimburilor gazoase tisulare și asupra utilizării unor substrate (consum, respectiv producție, de acid lactic și consum de glucoză). În același timp urmărirea pătrunderii tisulare a moleculelor aparținînd unei asemenea serii permite obținerea de informații asupra posibilității de a folosi prezența PAH-ului în moleculă drept vector renotrop pentru combinații relativ lipofile.

În lucrarea de față sînt prezentate rezultatele obținute în direcțiile de mai sus cu octanoil-PAH și miristoil-PAH. O parte din rezultatele lucrării de față au fost prezentate și în altă parte [6], [7].

MATERIAL ȘI METODĂ

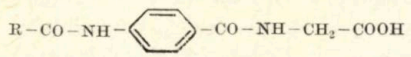
Compușii acil-PAH (vezi tabela 1) au fost sintetizați prin N-acilarea acidului p-aminohipuric cu clorurile acide respective, în piridină [6].

Compuşii I şi IV nu au fost utilizaţi în lucrarea de faţă, a fost folosit însă acetil-PAH, sintetizat similar cu compuşii din tabela 1.

Tabela 1

Compuşi acilaţi cu PAH obţinuţi prin sinteză [6]

Compusul	R	Denumirea
I	$-(CH_2)_4-CH_3$	acid p-(hexanoil-amino)-hipuric *
II	$-(CH_2)_6-CH_3$	acid p-(octanoil-amino)-hipuric **
III	$-(CH_2)_{12}-CH_3$	acid p-(tetradecanoil-amino)-hipuric ***
IV	$-(CH_2)_{14}-CH_3$	acid p-(hexadecanoil-amino)-hipuric ****



Prescurtări în text:
* caproil-PAH
** octanoil-PAH
*** miristoil-PAH
**** palmitoil-PAH

Schimburile gazoase (Q_{O_2}, Q_{CO_2}, respectiv, Q_R) au fost urmărite pe un preparat de tubi renali izolaţi [8], printr-o tehnică manometrică originală, bazată pe principiul celei de-a doua metode Dickens-Simmer [9]. Transportul PAH, acetil-PAH, octanoil-PAH şi miristoil-PAH au fost puse în evidenţă prin acumularea tisulară a acestora în felii de rinichi de şobolani, conform metodei lui Cross şi Taggart [10]; PAH a fost determinat după Bratton şi Marschall [11], de asemenea şi compuşii acil-PAH, dozarea fiind precedată în acest caz de o hidroliză acidă. Acidul lactic a fost determinat după Barker şi Summerson, iar glucoza după metoda Somogyi [12]. Analiza cinetică a caracterului procesului de inhibare, precum şi calcularea constantei Michaelis a transportului neinhibat, respectiv inhibat, au fost făcute după procedeul Lineweaver-Burk [13], precum şi după Hunter şi Downs [14]. Valorile găsite au fost exprimate ca medie aritmetică $\pm$ eroarea standard a mediei, iar pentru compararea statistică a rezultatelor a fost utilizat testul „t" al lui Student [15].

REZULTATE

În tabela 2 sînt redate sinoptic rezultatele privind consumul de oxigen, producţia de bioxid de carbon, coeficientul respirator şi variaţiile de glucoză şi acid lactic (exprimate în µl/mg, respectiv µmoli/mg substanţă uscată/oră).

În prezenţa octanoil-PAH, respectiv a miristoil-PAH, similar cu ceea ce se constată în cazul prezenţei PAH, coeficientul respirator creşte faţă de martor, indicînd o reducere a arderii lipidelor. În acelaşi sens pledează şi rezultatele privind variaţia acidului lactic şi a consumului de glucoză. Se remarcă efectul mai pronunţat de creştere a coeficientului respirator, determinat de prezenţa miristoil-PAH.

Tabela 2

Schimburile gazoase și variația concentrației acidului lactic și a glucozei (explicații în text)

Condițiile de experiență	Nr. exp.	QO_2	QCO_2	QR	QM	QG
Martor	6	32,5±3,7	27,0±3,2	0,82±0,02	−0,070±0,010	−0,071±0,012
PAH $0{,}5\cdot10^{-4}$ M	5	29,3±3,5	28,5±2,6	0,98±0,04*	0	−0,261±0,039*
Octanoil-PAH 10^{-3} M	5	35,5±4,1	32,5±3,8	0,91±0,04	−0,575±0,053*	−0,303±0,045*
Miristoil-PAH 10^{-3} M	5	37,7±5,1	38,5±3,6*	1,05±0,06*	−0,153±0,018*	−0,278±0,028*

* = diferența față de martor statistic semnificativă ($p, <0{,}05$).

Figurile 1 și 2 redau analizele Lineweaver-Burk, respectiv Hunter-Downs ale acțiunii de inhibare exercitate de octanoil-PAH 10^{-3} M asupra arderii lipidelor. Producția de CO_2 de origine lipidică a fost calculată pe

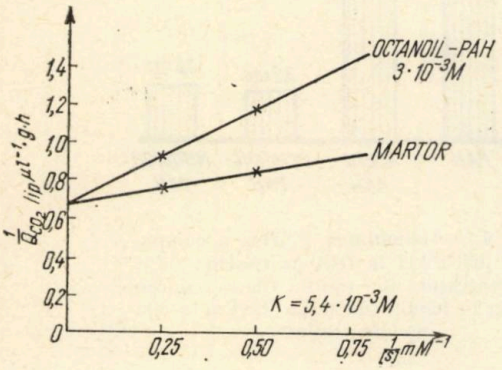


Fig. 1. — Analiza Lineweaver-Burk a cineticii procesului de inhibare a producției de CO_2 de origine lipidică (QCO_2 lip) de către octanoil-PAH; (S) = concentrația octanoatului în mediu; K = constanta Michaelis a procesului neinhibat.

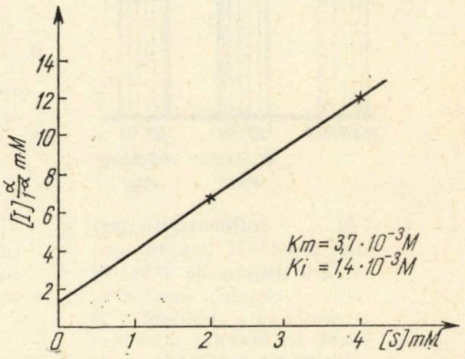


Fig. 2. — Analiza Hunter-Downs privind cinetica inhibării producției de CO_2 de origine lipidică de către octanoil-PAH. α = raportul producției de CO_2 lipidic dintre procesul inhibat și cel neinhibat; (I) = concentrația octanoil-PAH; (S): concentrația acidului octanoic (concentrațiile se referă la mediul de incubare), Km = constanta Michaelis a procesului în absența inhibitorului; K_i = aceeași constantă a procesului în prezența octanoil-PAH.

baza coeficientului respirator și a producției de CO_2, admițînd că Q_R = = 0,70 corespunde arderii exclusiv de lipide, iar Q_R = 1,00 lipsei totale de ardere a acestora. Datele din literatură susțin valabilitatea acestui procedeu, dat fiind consumul relativ redus de aminoacizi al țesutului renal [2].

După cum rezultă din ambele tipuri de analiză, inhibiția exercitată de octanoil-PAH (în concentrații de 10^{-3} M) asupra producției de bioxid de carbon de origine lipidică este de tip competitiv.

Figura 3 redă procentual efectul exercitat de prezenţa octanoil-PAH respectiv miristoil-PAH (în concentraţie de 10^{-3} M) asupra acumulării tisulare a PAH prezent concomitent (la concentraţia PAH de 0,5. 10^{-4} M). Se constată un efect net de reducere a acumulării PAH, în prezenţa celor două substanţe cercetate, mai pronunţat pentru miristoil-PAH.

În figura 4 este evidenţiată intensitatea acumulării renale a trei compuşi acil-PAH, comparativ cu acumularea tisulară a PAH, şi anume a acetil-, octanoil- şi a miristoil-PAH. În toate aceste cazuri, concentraţia substanţelor testate a fost în aşa fel aleasă, încît a corespuns aproximativ unei concentraţii de 1 mg/100 ml PAH, cunoscînd că trans-

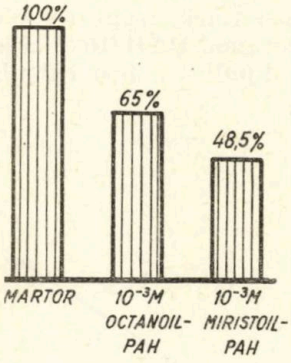


Fig. 3. — Influenţa compuşilor acil-PAH asupra acumulării tisulare de PAH în felii de rinichi; martor = acumularea tisulară a PAH, în absenţa substanţelor de tip acil-PAH, considerată = 100 %.

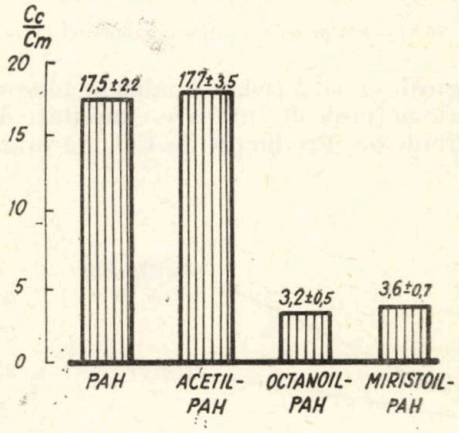


Fig. 4. — Acumularea PAH şi a compuşilor acil-PAH în felii de rinichi; *Cc* = concentraţia în ţesut; *Cm* = concentraţia în mediu (de unde *Cc*/*Cm* = acumulare tisulară).

portul acestuia este optim pentru concentraţii sub 2 mg/100 ml. Rezultă din datele acestei figuri că în timp ce transportul acetil-PAH este de intensitate similară cu cea a PAH, în schimb octanoil-PAH şi miristoil-PAH se transportă cu intensitate mult mai redusă, aproximativ 20% din primele două. Acumularea tisulară a octanoil-PAH nu diferă semnificativ faţă de cea a miristoil-PAH.

DISCUŢII

Ţesutul renal utilizează acizii graşi ca substrat preferat, aşa cum reiese aceasta în mod evident din numeroase lucrări [2]—[4]. În acest cadru ţesutul renal se deosebeşte de alte ţesuturi prin preluarea preferenţială a acizilor graşi liberi cu lanţ scurt, în special a acidului octanoic

[3]. Este ştiut de asemenea că acizii graşi în general şi octanatul în special [5], [6], [16] împiedică transportul renal al PAH. Pe de altă parte, într-o lucrare anterioară [1] am pus în evidenţă inhibarea de către PAH a arderii octanatului în ţesutul renal. Mai este cunoscută acţiunea de favorizare pe care prezenţa acetatului o exercită asupra transportului PAH [10], [17]. O explicaţie posibilă a acestor două acţiuni inhibitoare alături de acţiunea stimulatoare exercitată de acetat ar putea fi dată de formarea, la polul sanguin al celulei renale, a unei molecule de tip acil-PAH (în prezenţa acetatului, de acetil-PAH), cu atît mai greu transportabile în interiorul celulei, cu cît catena acilului este mai lungă.

Datele noastre aduc argumente în favoarea acestei explicaţii; ele arată că în prezenţa moleculelor de tip acil-PAH se produc modificări în utilizarea de substrate, asemănătoare celor survenite în prezenţa PAH. Acţiunea inhibitoare exercitată de prezenţa octanoil-PAH asupra arderii de octanat este de tip competitiv, ceea ce pledează pentru interpretarea inhibiţiei exercitate ca inhibiţie primară a transportului şi nu a metabolizării octanatului. Pe lîngă aceasta, compuşii de tip acil-PAH nu prezintă nici un indiciu structural care să interfereze cu componenţii ce intervin în calea majoră a oxidării acizilor graşi, cu excepţia posibilităţii reacţiei cu coenzima A, la gruparea carboxil. Această grupare însă este areactivă în sensul formării tioesterilor, ceea ce s-a dovedit prin experienţe cu carboxil marcat cu ^{18}O [18]. Este de remarcat că moleculele de tip acil-PAH s-au dovedit capabile de a realiza pe lîngă inhibarea arderii acizilor graşi liberi şi inhibarea transportului PAH, aşa cum rezultă din datele figurii 3.

Se constată de asemenea că deşi acumularea renală a moleculelor de tip acil-PAH este redusă mult faţă de aceea a PAH, totuşi, atît pentru octanoil-PAH, cît şi pentru miristoil-PAH se realizează încă o concentrare de 3—4 ori faţă de mediu. Se pune în acest fel în evidenţă posibilitatea folosirii PAH ca vector renotrop pentru molecule cu hidrofilie redusă sau pentru vectorizarea unor molecule cu acţiune asupra metabolismului renal [16], dar care nu sînt transportate activ în celula renală [7].

Este de reţinut faptul că în seria alifatică acil-PAH trecerea de la acetil-PAH la octanoil-PAH reduce indicele de acumulare la o valoare aproximativ stabilă, acumularea miristoil-PAH fiind aproximativ de acelaşi ordin de mărime cu aceea a octanoil-PAH.

CONCLUZII

Din cele arătate mai sus rezultă că este posibil ca formarea prin biosinteză a unor molecule de tip acil-PAH să determine acţiunea reciprocă de inhibiţie a transportului PAH şi a acizilor graşi, constatată în prezenţa concomitentă a acestora; pentru obţinerea unei decizii în

această problemă mai este necesar de a se pune în evidenţă apariţia în ţesut a acestor molecule.

În acelaşi timp apare evident că introducerea moleculei PAH în compuşi hidrofobi de tipul acizilor graşi conferă noii molecule un oarecare caracter renotrop, ceea ce arată că PAH poate fi utilizat ca vector renal în molecule mai complexe.

Prezentat la redacţie
la 14 octombrie 1971

Disciplina de biochimie clinică
Laboratorul de radioizotopi
Institutul de medicină Timişoara

IN VITRO EFFECTS OF CERTAIN ACYLATED COMPOUNDS OF p-AMINOHIPPURIC ACID ON ENERGY METABOLISM AND p-AMINOHIPPURATE TRANSPORT IN THE RAT KIDNEY

SUMMARY

The effects of certain N-acylated compounds of p-aminohippuric acid (synthetized by one of the authors, D.O.) on gas exchange, respiratory quotient and glucose and lactic acid consumption of rat kidney slices and isolated tubules were tested.

The influence of acyl-PAH compounds on the p-aminohippurate transport is also studied and, on the basis of the findings, the metabolic mechanism that may be involved in the transport processes, as well as its possible relationships with the transport of fatty acids, are interpreted.

BIBLIOGRAFIE

1. G. Deutsch, O. Dreichlinger, Fiziol. norm. patol., **15**, 163 (1969).
2. J. Cohen, Amer. J. Physiol., **199**, 650 (1960).
3. M. Gold, J.J. Spitzer, Amer. J. Physiol., **206**, 158 (1964).
4. B.J. Lee, V. K. Vance, J. F. Cahill, Amer. J. Physiol., **182**, 597 (1955).
5. D. Schachter, J. G. Manis, J.V. Taggart, Amer. J. Physiol., **182**, 537 (1955).
6. O. Dreichlinger, *Sinteza unor substanţe cu activitate asupra metabolismului rinichiului*, Teză de doctorat, Institutul politehnic Timişoara, 1968.
7. O. Dreichlinger, G. Deutsch, *Principiu de vectorizare în transportul celular renal al unor substanţe organice*, Comunicare la Sesiunea Subcomisiei de biochimie a Acadr R.S. România, Timişoara, 12 iunie 1968.
8. G. Deutsch, O. Dreichlinger, Timişoara medicală, **14**, 129 (1969).
9. G. Deutsch, O. Dreichlinger, St. de embriol. şi citol., Seria embriologie, **5**, 185 (1968).
10. J. Cross, J.V. Taggart, Amer. J. Physiol., **161**, 181 (1950).
11. A.C. Bratton,C.K. Muschall jr., J. Biol. Chem., **128**, 537 (1939).
12. M. Somogyi,N. Nelson, în : A. Kisérleti orvostudomány vizsgáló módszerei (ed. A. Kovach), vol. 4, Ed. Akademia, Budapesta, 1958, p. 808.

13. H. Lineweaver, D. Burk, J. Amer. Chem. Soc., **56**, 658 (1934), in : H. Netter, Theoretische Biokemie, Springer, Berlin, 1959, p. 282.
14. A. Hunter, C.E. Downs, J. Biol. Chem., **157**, 427 (1945), în : Hoppe-Seyler/Thierfelder : Hdbuch. physiol. u. path-physiol. chem. Analyse, Springer, 1964, Berlin, vol. 6, partea A, p. 52.
15. A.G. Worthing, J. Geffner, *Prelucrarea datelor experimentale*, Edit. tehnică, Bucureşti, 1959.
16. R. Richterich, in : Diurese und Diuretica (Ed. E, Buchborn, K.D. Bock), Springer, Berlin, 1954, p. 19.
17. G.H. Mudge, Amer. J. Physiol., **173**, 511 (1953).
18. B. Andersen, H.H. Ussing, Active transport, in : M. Florkin, H.S. Masson (ed), Comparative biochemistry, Academic Press, New York, 1960, vol. 2, p. 384.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 1, 17–22 (1973)

CERCETĂRI COMPARATIVE ASUPRA AMINOACIZILOR LIBERI DIN *PHRAGMITES AUSTRALIS* (Cav.) Trin. et Stend., *TYPHA ANGUSTIFOLIA* L., *TYPHA LATIFOLIA* L. ŞI *SCIRPUS LACUSTRIS* L.

ILEANA HURGHIŞIU

Rezumat. — *Phragmites australis* (Cav.) Trin. et Stend., *Typha angustifolia* L., *Typha latifolia* L. şi *Scirpus lacustris* L., crescute în condiţii ecologice diferite, Delta Dunării şi împrejurimile capitalei, pe sărătură şi plaur, sînt caracterizate prin modificarea aminoacizilor liberi.

Analizele s-au efectuat în iunie şi septembrie 1970.

Numărul şi conţinutul aminoacizilor liberi diferă de la o specie la alta, depinzînd de organul analizat, faza de vegetaţie a plantei şi condiţiile ecologice.

Modificări semnificative s-au găsit la cistină, cisteină, acid aspartic, serină, glicocol, alanină, tirozină, metionină, valină, fenilalanină şi leucină.

Se cunosc cercetări numeroase efectuate la *Phragmites australis* (Cav.) Trin. et Stend. în privinţa anatomiei şi condiţiilor biologice de dezvoltare [1]—[5].

Studii asupra nutriţiei minerale la stuf au efectuat Roman şi colab. [6], [7], Ilieş [8]—[10] şi alţii.

În privinţa factorilor endogeni, compoziţia şi modificările biochimice care au loc la nivelul unor organe la macrofite emerse, în diferite condiţii ecologice, în cursul perioadei de vegetaţie, cercetările sînt mai puţine. Rozmarin şi colab. [11], Solomon şi colab. [12], Simionescu şi colab. [13] au efectuat cercetări asupra conţinutului în hidraţi de carbon.

Aminoacizii liberi din plante superioare s-au cercetat de către Fowden [14], Keser [15], Lamport şi Northcote [16], Linskens şi Knapp [17] şi alţii.

În lucrări anterioare [18], [19] s-a efectuat un studiu comparativ asupra aminoacizilor liberi din apă, nămol şi *Phragmites australis* (Cav.) Trin. et Stend., la nivelul diferitelor organe ale acestuia. Experienţele cu aminoacizi marcaţi cu ^{14}C au arătat că există posibilitatea de absorbţie a acestora prin rădăcinile adventive de pe tulpini şi transportul lor în frunze.

Deoarece pînă în prezent nu s-a efectuat un studiu comparativ asupra aminoacizilor liberi din *Phragmites australis* (Cav.) Trin. et Stend., *Typha angustifolia* L., *Typha latifolia* L. şi *Scirpus lacustris* L., din diferite condiţii ecologice, în cursul perioadei de vegetaţie, la nivelul unor organe ale plantelor, ne-am propus să realizăm acest lucru în lucrarea de faţă.

MATERIAL ȘI METODĂ

Determinările s-au efectuat în iunie și septembrie 1970.

Stațiile cercetate sînt Ghiolul Roșu (Delta Dunării) și Balta Comana (împrejurimile capitalei).

S-a lucrat cu *Phragmites australis* (Cav.) Trin. et Stend., *Typha angustifolia* L., *Typha latifolia* L. și *Scirpus lacustris* L., recoltate de pe aluviuni salinizate și plaur. Plantele s-au separat pe organe, și anume: lăstari, rădăcini adventive de pe rizomi și tulpini, rizomi, tulpini, frunze și inflorescențe. S-a lucrat cu probe medii, 5 g țesut.

Extracția aminoacizilor liberi s-a făcut după tehnica indicată într-o lucrare anterioară [18].

Ca solvent pentru migrare s-a folosit n butanol-acid acetic-apă 4 : 1 : 1 [20], [21]. Migrarea aminoacizilor s-a făcut ascendent, timp de 48 de ore. Cromatogramele s-au pulverizat cu ninhidrină 0,2% în butanol. S-au făcut aprecieri calitative.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele sînt cuprinse în tabelele 1—4.

Din tabela 1 rezultă că există diferențe în privința conținutului în aminoacizi liberi la cele trei specii recoltate din Ghiolul Roșu și de la un organ la altul al plantei. La *Phragmites australis* (Cav.) Trin. et Stend.,

Tabela 1

Aminoacizi liberi din *Phragmites australis* (Cav.) Trin. et Stend., *Typha angustifolia* L. și *Scirpus lacustris* L. recoltate din Ghiolul Roșu, de pe aluviuni salinizate (Delta Dunării)

Nr. crt.	Aminoacizi	*Phragmites australis*		*Typha angustifolia*			*Scirpus lacustris*	
		T	F	T	F	I	T	I
1	Cistină	−	−	+	+	+	+	+
2	Cisteină	+	+	+	+	+	+	+
3	Lizină	+	+	+	+	+	+	+
4	Histidină	+	+	+	+	+	+	+
5	Argunină	+	+	+	+	+	+	+
6	Acid aspartic	+	+	+	+	+	+	+
7	Serină	+	+	+	+	+	+	+
8	Glicocol	+	+	+	+	+	+	+
9	Acid glutamic	+	+	+	+	+	+	+
10	Treonină	+	+	+	+	+	+	+
11	Alanină	+	+	+	+	+	+	−
12	Prolină	−	−	−	−	−	−	−
13	Tirozină	−	+	+	+	+	+	−
14	Metionină	+	+	+	+	+	+	−
15	Valină	−	+	+	+	−	+	−
16	Fenilalanină	−	+	+	+	−	+	−
17	Leucină	−	+	−	−	−	−	−
	TOTAL	11	15	15	15	13	15	10

Notă: T = tulpini, F = frunze, I = inflorescențe, + aminoacidul este prezent; − aminoacidul lipsește.

în tulpini se găsește un număr redus de aminoacizi (11) în comparație cu *Typha angustifolia* L. și *Scirpus lacustris* L. (15). La *Typha angustifolia* L. s-a găsit un număr crescut de aminoacizi în inflorescențe (13), în comparație cu cei identificați la *Scirpus lacustris* (10). Modificări semnificative apar la cistină, alanină, tirozină, metionină, valină, fenilalanină și leucină.

Tabela 2 arată că la *Phragmites australis* (Cav.) Trin. et Stend., recoltat din Balta Comana, apar diferențe semnificative în conținutul

Tabela 2

Aminoacizi liberi din *Phragmites australis* (Cav.) Trin.et Stend. recoltate din Balta Comana de pe aluviuni salinizate și plaur (împrejurimile capitalei)

Nr. crt.	Aminoacizi	VI								IX					
		Aluv. salinizate				Plaur				Aluv. salinizate			Plaur		
		Rz.	R. ad. t.	T	F	Rz.	R. ad. t.	T	F	Rz.	L	T	Rz.	L	T
1	Cistină	−	−	+	+	+	−	+	+	−	−	−	−	−	+
2	Cisteină	−	−	+	+	+	−	+	+	−	−	−	−	−	+
3	Lizină	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	Histidină	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	Arginină	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	Acid aspartic	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+
7	Serină	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+
8	Glicocol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+
9	Acid glutamic	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+
10	Treonină	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+
11	Alanină	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	Prolină	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
13	Tirozină	+	−	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	−
14	Metionină	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	−
15	Valină	+	+	+	+	−	+	+	+	−	+	−	+	−	+
16	Fenilalanină	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
17	Leucină	−	+	−	−	−	−	+	+	−	+	−	−	−	−
	TOTAL	13	13	14	14	12	12	15	15	11	10	10	14	6	12

Notă: Rz. = rizomi, R.ad.t. = rădăcini adventive de pe tulpini, T = tulpini, F = frunze, L = lăstari. + aminoacidul este prezent; − aminoacidul lipsește.

aminoacizilor liberi de la o perioadă de vegetație la alta, în funcție de condițiile ecologice, și de la organ la organ. În iunie s-a găsit un număr crescut de aminoacizi liberi în comparație cu cei găsiți în septembrie, cînd aceștia sînt reduși. *Phragmites australis* (Cav.) Trin. et Stend., recoltat de pe aluviuni salinizate și plaur în iunie, are un număr crescut de aminoacizi în comparație cu cel găsit la probele din septembrie, în aceleași condiții ecologice. Plantele recoltate de pe aluviuni salinizate în iunie au un număr crescut de aminoacizi liberi în tulpini și frunze (14), iar în septembrie în rizomi (11). Pe plaur, în iunie, plantele au prezentat un număr crescut de aminoacizi în tulpini și frunze (15), iar în septembrie în rizomi (14) și în tulpini (12). Modificări semnificative s-au găsit la cistină, cisteină, acidul aspartic, serină, glicocol, tirozină, metionină, valină, fenilalanină și leucină.

În tabela 3 se vede că la *Typha latifolia* L., recoltată din Balta Comana, apar modificări în conținutul aminoacizilor liberi de la o perioadă de vegetație la alta, de la organ la organ, în funcție de condițiile ecologice. În iunie, numărul aminoacizilor liberi este mare în comparație cu cel găsit în septembrie. Tot în iunie la plantele crescute pe aluviuni

Tabela 3

Aminoacizi liberi din *Typha latifolia* L. recoltate din Balta Comana de pe aluviuni salinizate și plaur (împrejurimile capitalei)

Nr. crt.	Aminoacizi	VI						IX					
		Aluv. salinizate			Plaur			Aluv. salinizate			Plaur		
		R. ad. rz.	Rz.	T	R. ad. rz.	Rz.	T	R. ad. rz.	Rz.	T	R. ad. rz.	Rz.	T
1	Cistină	—	+	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—
2	Cisteină	—	+	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—
3	Lizină	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	Histidină	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	Arginină	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	Acid aspartic	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	Serină	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+
8	Glicocol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—
9	Acid glutamic	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	Treonină	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+
11	Alanină	+	+	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+
12	Prolină	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
13	Tirozină	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
14	Metionină	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
15	Valină	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
16	Fenilalanină	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
17	Leucină	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	TOTAL	9	11	12	7	11	13	8	9	9	7	9	8

Notă: R.ad.rz. = rădăcini adventive de pe tulpini, Rz = rizomi, T = tulpini.
+ aminoacidul este prezent; — aminoacidul lipsește.

salinizate s-a identificat un număr crescut de aminoacizi în rizomi (11), iar în septembrie în tulpini (10). La plantele recoltate de pe plaur în iunie s-a găsit un număr crescut de aminoacizi în tulpină (12), iar în septembrie în rizomi (9). Modificări semnificative apar în conținutul următorilor aminoacizi: cistină, cisteină, alanină, tirozină, metionină și valină.

Tabela 4 arată conținutul în aminoacizi liberi la *Scirpus lacustris* L., recoltat din Balta Comana de pe plaur. Se găsesc diferențe semnificative în conținutul aminoacizilor liberi de la o perioadă de vegetație la alta și de la organ la organ. În iunie, în rizomi și tulpini, numărul aminoacizilor este crescut (14, respectiv, 13), în comparație cu cel găsit în septembrie (12, respectiv, 11). În septembrie un număr mare de aminoacizi liberi s-a găsit în inflorescențe (13). Modificări semnificative apar la cistină, tirozină, metionină și valină.

Cercetările efectuate acum confirmă rezultatele pe care le-am obținut în lucrări anterioare [18], [19], aducînd date noi asupra conținutului în aminoacizi liberi la *Typha angustifolia* L., *Typha latifolia* L. și *Scirpus lacustris* L.

Tabela 4

Aminoacizi liberi din *Scirpus lacustris* L. recoltate din Balta Comana de pe plaur (împrejurimile capitalei)

Nr. crt.	Aminoacizi	VI		IX		
		Rizomi	Tulpini	Rizomi	Tulpini	Inflorescenţe
1	Cistină	+	+	—	+	+
2	Cisteină	+	+	+	+	+
3	Lizină	+	+	+	+	+
4	Histidină	+	+	+	+	+
5	Arginină	+	+	+	+	+
6	Acid aspartic	+	+	+	+	+
7	Serină	+	+	+	+	+
8	Glicocol	+	+	+	+	+
9	Acid glutamic	+	+	+	+	+
10	Treonină	+	+	+	+	+
11	Alanină	+	+	+	+	+
12	Prolină	—	—	—	—	—
13	Tirozină	+	+	+	—	+
14	Metionină	+	+	+	—	+
15	Valină	+	—	—	—	—
16	Fenilalanină	—	—	—	—	—
17	Leucină	—	—	—	—	—
	TOTAL	14	13	12	11	13

Notă: + aminoacidul este prezent; — aminoacidul lipseşte.

Comparînd conţinutul în aminoacizi liberi la cele patru specii, se constată că apar diferenţe semnificative de la specie la specie şi de la organ la organ, în funcţie de perioada de vegetaţie şi de condiţiile ecologice în care ele s-au dezvoltat. La *Phragmites australis* (Cav.) Trin. et Stend., *Typha angustifolia* L. şi *Scirpus lacustris* L. s-a găsit un număr crescut de aminoacizi liberi, în comparaţie cu cei de la *Typha latifolia* L. O acumulare a aminoacizilor s-a constatat în tulpini şi frunze. Speciile recoltate din Delta Dunării sînt mai bogate în aminoacizi liberi decît cele din împrejurimile capitalei, Balta Comana. Spre sfirşitul perioadei de vegetaţie a plantelor, în septembrie, se constată o reducere semnificativă a aminoacizilor liberi la nivelul diferitelor organe ale plantelor.

Datorită faptului că într-o lucrare anterioară [19] am constatat că aminoacizii liberi pătrund din mediu (apă şi nămol) în plante prin rădăcinile adventive de pe tulpini, sînt transportaţi în frunze, şi în lucrarea de faţă am identificat un număr crescut de aminoacizi în organele tinere, cînd are loc o creştere intensă a macrofitelor emerse, sîntem de părere că aceştia au un rol important în sporirea biomasei vegetale.

CONCLUZII

1. Conţinutul de aminoacizi liberi prezintă variaţii de la specie la specie, de la organ la organ, în funcţie de perioada de vegetaţie şi de condiţiile ecologice.

2. Modificările constau în scăderea sau în creșterea numerică a aminoacizilor liberi sau în înlocuirea unora cu alții.

3. Modificări semnificative s-au observat la următorii aminoacizi liberi : cistină, cisteină, acidul aspartic, serină, glicocol, alanină, tirozină, metionină, valină, fenilalanină și leucină.

4. Aminoacizii au un rol deosebit în sporirea biomasei vegetale a macrofitelor emerse.

Prezentat la redacție la
10 aprilie 1972

Institutul de biologie „Traian Săvulescu"
Secția de ultrastructuri celulare

COMPARATIVE INVESTIGATIONS ON AMINO ACIDS FROM *PHRAGMITES AUSTRALIS* (Cav.) Trin. et Stend., *TYPHA ANGUSTIFOLIA* L., *TYPHA LATIFOLIA* L. AND *SCIRPUS LACUSTRIS* L.

SUMMARY

Phragmites australis (Cav.) Trin. et Stend., *Typha angustifolia* L., *Typha latifolia* L. and *Scirpus lacustris* L., growing in different ecological conditions, Danube Delta and near Bucharest, on salt marsh and floating reed islet, are characterized by the modification of free amino acids.

The analyses were performed in June and September 1970.

The number and content în free amino acids differ from one species to another, depending on the analysed organ, the plant vegetation phase and ecological conditions.

Significant modifications were recorded at the level of cystine, cysteine, aspartic acid, serine, glycocoll, alanine, tyrosine, methionine, valine, phenylalanine and leucine.

BIBLIOGRAFIE

1. L. Rudescu, C. Niculescu, I.P. Chivu, *Monografia stufului*, București, Edit. Academiei, 1965, p. 1.
2. A. Popescu, Teză de doctorat, Universitatea București (1970).
3. L. Hnidei, Celuloză și hîrtie, **17**, 142(1968).
4. L. Hnidei, Celuloză și hîrtie, **17**, 187(1968).
5. L. Hnidei, Celuloză și hîrtie, **17**, 397(1968).
6. T. Roman, L. Roman, I. Milea, Celuloză și hîrtie, **17**, 314(1968).
7. L. Roman T. Roman, I. Milea, Celuloză și hîrtie, **18**, 1(1969).
8. C. Ilieș, ,Celuloză și hîrtie, **17**, 97(1968).
9. C. Ilieș, Celuloză și hîrtie, **17**, 489(1968).
10. C. Ilieș, Celuloză și hîrtie, **18**, 267(1969).
11. Gh. Rozmarin, B. Solomon, Cr. Simionescu, Celuloză și hîrtie, **17**, 230(1968).
12. B. Solomon, Gh. Rozmarin, Cr. Simionescu, Celuloză și hîrtie, **17**, 447(1968).
13. Cr. Simionescu, B. Solomon, Gh. Rozmarin, Celuloză și hîrtie, **18**, 207(1969).
14. L. Fowden, Biol. Reviews, **33**, 393(1958).
15. M. Keser, Planta, **45**, 273(1955).
16. D.T.A. Lamport, D.H. Northcote, Natura, Londra, **188**, 665 (1960).
17. H.F. Linskens, R. Knapp, Planta, **45**, 106(1955).
18. L. Rudescu, I. Hurghișiu, Hidrobiologia, **13**(1972).
19. L. Rudescu, I. Hurghișiu, Gh. Popovici, Arch. hidrob. (sub tipar).
20. I.M. Haïs, K. Macek, *Cromatografia pe hîrtie*, București, Edit. tehnică, 1960, p. 1.
21. I. Tănase, *Tehnica cromatografică*, București, Edit. tehnică, 1967, p. 25.

ST. CERC. BIOCHIM., 16 1, 23–27 (1973)

IZOPEROXIDAZELE DIN FRUNZELE DE TOMATE INFESTATE CU MUSCULIȚA ALBĂ DE SERĂ (*TRIALEURODES VAPORARIORUM* WESTW.) ÎNAINTE ȘI DUPĂ COMBATEREA ACESTEIA CU INSECTICIDE

VALENTINA JURCĂ și ANGELA REUS

Rezumat. — S-au cercetat izoenzimele peroxidazice în frunzele de tomate infestate cu *Trialeurodes vaporariorum* Westw. și comportarea acestor izoenzime după combaterea acestui dăunător cu unele substanțe fitofarmaceutice. Pe baza izoenzimogramelor obținute s-au constatat modificări cantitative în activitatea peroxidazei la plantele infestate și la cele tratate cu unele insecticide. Aspectul spectrului izoperoxidazic poate constitui un test pentru caracterizarea eficacității unor insecticide.

Peroxidaza (1. 11. 1. 7. — donator : H_2O_2 oxidoreductaza) este o enzimă foarte răspîndită la plante și căreia i se atribuie multiple funcții [1].

Unele indicații din literatură scot în evidență eterogenitatea moleculară a peroxidazelor din diferite materiale vegetale : muguri, frunze și rădăcini de petunii [2], frunze de tutun [3], [4], frunze de fasole [3], [5], diferite părți ale plantei de mazăre [3], [7], rădăcini de hrean [8] etc.

Apariția și activitatea unor izoperoxidaze în plante s-a dovedit a fi legată de anumite funcții biologice, cum ar fi creșterea plantelor [9], [10], reacția de apărare împotriva bolilor [5], [11].

Întrucît *Trialeurodes vaporariorum* Westw. este un dăunător care atacă numeroase specii de plante de seră, ca : vinete, ardei, castraveți, provocînd însă pagube mari în special la culturile de tomate, am considerat că ar fi interesant, din punct de vedere teoretic, și util, din punct de vedere practic, să urmărim cum se reflectă acțiunea dăunătoare a acestei insecte asupra izoenzimelor peroxidazei din frunzele de tomate, cît și comportarea acestor izoenzime după combaterea cu unele insecticide.

MATERIAL ȘI METODE

Ca material biologic am folosit extractele proteice din frunzele plantelor de tomate, soiul Money-Maker, cultivate în seră în condiții pedoclimatice corespunzătoare tehnicii culturii forțate de roșii [12].

Frunzele au fost recoltate în perioada de început de coacere a fructelor de tomate, de la etajul inferior (frunza 1—6), de la etajul mijlociu

(frunza 6—12) şi de la etajul superior (de la frunza a 12-a la vîrful plantei).

Materialul vegetal infestat, şi cel infestat şi tratat cu insecticide care a fost în prealabil curăţat manual de parazit, cît şi cel neinfestat, s-a spălat de 2—3 ori cu apă distilată (pentru îndepărtarea eventualelor musculiţe rămase, a urmelor de insecticide şi a prafului de pe suprafaţa frunzelor) şi uscat apoi cu hîrtie de filtru, a fost mojarat la rece în tampon Tris-HCl 0,1 M, pH = 8, ce conţinea la 100 ml 17 g zaharoză, 0,1 g acid ascorbic şi 0,1 g clorhidrat de cisteină monohidratată [13]. Omogenatul obţinut s-a centrifugat la 6 000 rot/min, timp de 20 de minute, iar pentru electroforeză s-a utilizat de fiecare dată o cantitate de supernatant conţinînd 400 γ proteină. Proteinele din supernatant s-au determinat prin metoda Lowry [14].

Electroforeza izoperoxidazelor s-a făcut vertical [15], în gel de poliacrilamidă 7% şi în tampon Tris-EDTA-borat, pH = 8,4 pe plăci de 13 × 8 cm la 280 V şi 25 mA/13 cm; timpul de migrare fiind 3 ore şi 30 de minute. Evidenţierea izoperoxidazelor s-a realizat prin imersia gelului în soluţie saturată de benzidină în apă oxigenată 1%, timp de 30 de minute.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Enzimogramele peroxidazei frunzelor de tomate neinfestate, de la cele trei etaje (*a*, *c*, *e*, fig. 1), posedă aceleaşi forme moleculare dar diferă ca intensitate a activităţii enzimatice. În cazul frunzelor de la etajul mijlociu (*c*) şi de la etajul inferior (*a*), fracţiunile izoperoxidazice prezintă o coloraţie mai intensă comparativ cu ale frunzelor de la etajul superior (*e*).

Frunzele plantelor infestate cu musculiţa albă de seră prezintă în genere o activitate enzimatică mult mai mare, evidenţiată atît printr-o coloraţie mult mai intensă, cît şi prin mărimea spoturilor (fig. 1, *b*, *d*, *f*). Rezultatele noastre sînt în concordanţă cu cele citate de literatură [16] referitoare la creşterea activităţii enzimelor participante la oxidarea fenolilor în cazul plantelor bolnave, infectate.

Din examinarea enzimogramelor plantelor infestate (fig. 1) reiese că cea mai intens colorată aparţine frunzelor de la etajul mijlociu (*d*), urmată de a frunzelor de la etajul inferior (*b*) şi de a celor de la etajul superior (*f*). Această diferenţiere în intensitatea activităţii enzimatice în funcţie de etaj este dependentă, probabil, de gradul de infestare şi de stadiile de dezvoltare biologică a parazitului.

În continuare am urmărit efectul unor substanţe fitofarmaceutice folosite în combaterea musculiţei albe de seră asupra izoenzimelor peroxidazei. Tratamentul chimic al plantelor infestate cu *Trialeurodes vaporariorum* Westw. s-a făcut în momentul cînd parazitul ajunsese la limita critică a densităţii numerice. Condiţiile şi modul de efectuare a tratamentelor chimice sînt redate într-o lucrare anterioară [12].

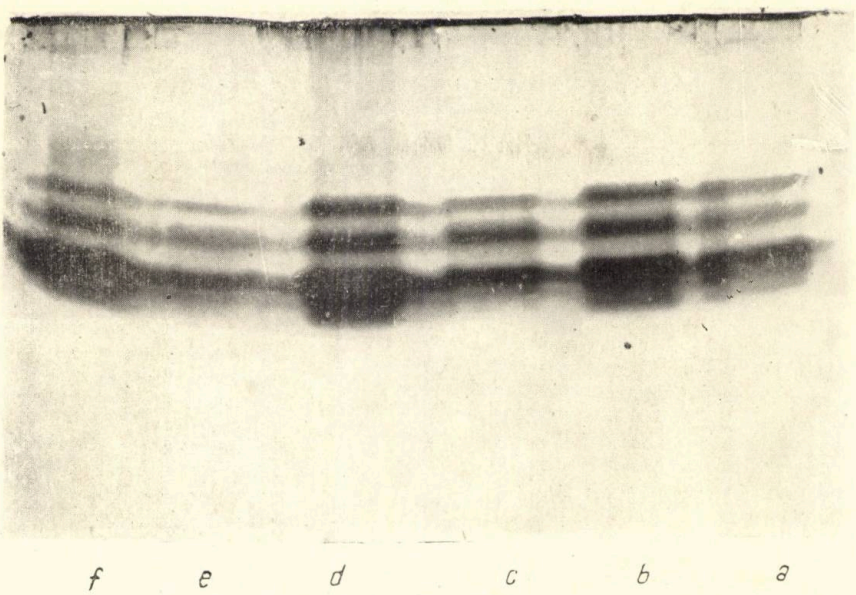


Fig. 1. Enzimogramele izoperoxidazelor din frunzele plantelor de tomate neinfestate și ale celor infestate cu *Trialeurodes vaporariorum* Westw.

Plante neinfestate: *a* – frunze etajul inferior; *c* – frunze etajul mijlociu; *e* – frunze etajul superior.
Plante infestate: *b* – frunze etajul inferior; *d* – frunze etajul mijlociu; *f* – frunze etajul superior.

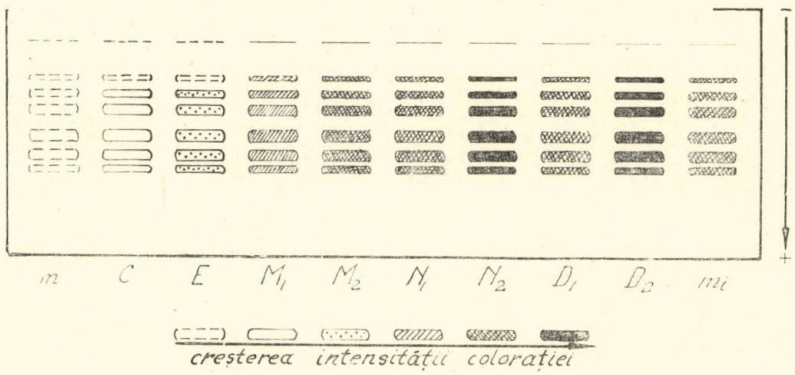


Fig. 2. Enzimogramele izoperoxidazelor frunzelor de tomate de la etajul mijlociu, după combaterea lui *Trialeurodes vaporariorum* Westw. cu insecticide în concentrații diferite.

C – carbetox: 0,4% și 0,3%; *E* – ekatox-50: 0,1% și 0,08%; M_1 – metaj-sistox 0,2%; M_2 – metasistox 0,15%; N_1 – nogos 0,1%; N_2 – nogos 0,08%; D_1 – diazinon 0,3%; D_2 – diazinon 0,2%; *m* – plante neinfestate; m_i – plante infestate și netratate.

Enzimogramele s-au efectuat cu extracte proteice din frunzele de la etajul mijlociu ale plantelor infestate și tratate cu ekatox-50 ($C_{10}H_{14}NO_5P_5$), metasistox ($_6H_{15}O_4S_2P$), nogos-50 ($C_4H_2O_4PCl_2$), carbotex ($C_{10}H_{10}$ O_6S_2P) și diazinon ($C_{12}H_{21}O_3N_2PS$). Fiecare substanță a fost folosită în două concentrații, în variante experimentale diferite (ekatox-50 : 0,1% și 0,08% ; metasistox : 0,2% și 0,15% ; nogos : 0,1% și 0,08% ; carbetox : 0,4% și 0,3% ; diazinon : 0,3% și 0,2%).

Am experimentat fiecare insecticid în două variante, deoarece rezultatele acestor cercetări aveau să ne dea posibilitatea de a aprecia, prin nivelul metabolic al plantei, dacă eficacitatea diferențiată a insecticidului depinde de concentrație. Noua orientare în combaterea dăunătorilor pe cale chimică preconizează reducerea numărului de tratamente [17].

Modelele electroforetice ale izoperoxidazelor, după 7 zile de la aplicarea tratamentelor chimice, sînt redate în figura 2. Enzimogramele plantelor tratate cu carbetox (C) 0,4% și 0,3% sau cu ekatox-50 (E) 0,1% și 0,08% nu diferă cu concentrația insecticidului. La plantele tratate cu metasistox, nogos-50 și diazinon, activitatea enzimatică a peroxidazei prezintă diferențe cantitative în funcție de concentrația insecticidului experimentat. Astfel, în cazul plantelor care au fost tratate cu concentrații mai mari de metasistox (M_1), nogos (N_1) și diazinon (D_1), izoenzimogramele sînt mai puțin intense, comparativ cu ale variantelor la care concentrația insecticidelor a fost mai mică (M_2, N_2, D_2).

Este de remarcat că activitatea peroxidazei la plantele tratate cu carbetox și ekatox-50, în ambele concentrații experimentale și cu metasistox în concentrația de 0,2% este mai mică decît la plantele infestate cu musculița albă de seră, iar la cele tratate cu metasistox în concentrație de 0,15%, nogos-50 și diazinon, în ambele concentrații, dar mai ales în cazul concentrațiilor mai mici, ea este egală sau chiar ceva mai intensă.

Enzimogramele plantelor tratate cu carbetox, insecticid care a prezentat eficiența cea mai mare asupra lui *Trialeurodes vaporariorum* Westw. [12], prezintă intensitatea cea mai slabă, neatingînd însă gradul intensității izoenzimogramei plantelor neinfestate, urmată de ale acelor tratate cu ekatox-50, metasistox, nogos-50 și diazinon (fig. 1).

Pe baza rezultatelor din lucrarea referitoare la eficiența produselor fitofarmaceutice experimentale în combaterea musculiței albe de seră [12] și a celor constatate în lucrarea de față, considerăm că activitatea peroxidazei poate constitui o posibilitate de investigare, la nivelul metabolismului plantei, a eficienței substanțelor fitofarmaceutice folosite în combaterea dăunătorilor.

CONCLUZII

Izoenzimogramele peroxidazei frunzelor de tomate infestate cu *Trialeurodes vaporariorum* Westw. prezintă o intensitate a activității enzimatice mai mare în comparație cu ale plantelor neinfestate, indiferent de stadiul lor de dezvoltare.

S-au constatat diferenţe în activitatea peroxidazei plantelor în urma tratamentelor chimice contra lui *Trialeurodes vaporariorum* Westw. în funcţie de concentraţia şi insecticidul experimentat. Există o dependenţă inversă între eficienţa tratamentului şi gradul de modificare a intensităţii enzimogramei izoperoxidazei.

Prezentată la redacţie la 10 martie 1972

Universitatea „Al. I. Cuza" Iaşi,
Laboratorul de chimie biologică şi
Catedra de fiziologia plantelor

THE ISO-PEROXIDASES IN TOMATO LEAVES INFESTED WITH GREENHOUSE WHITEFLY (*TRIALEURODES VAPORARIORUM* WESTW.) BEFORE AND AFTER INSECTICIDE CONTROL

SUMMARY

The iso-peroxidase pattern from the tomato leaves infested with *Trialeurodes vaporariorum* Westw., presents a higher enzymatic intensity as compared to that of the uninfested plants, irrespective of their developmental stage.

Differences have been found in the activity of the plant peroxidases, as a result of chemical treatments against *Trialeurodes vaporariorum* Westw., depending on the insecticide tested and its concentration.

Thus, the plants treated with Carbetox exibit an isoperoxidase pattern of the lowest intensity, followed by those plants treated with Ekatox-50, Metasistox, Nogos-50 and Diazinon. The intensity of the iso-peroxidase pattern, in the plants treated with Carbetox and Ekatox-50, does not depend on the insecticide concentration, while in the plants treated with Metasistox, Nogos and Diazinon the intensity of the iso-peroxidase pattern is inversely dependent on the insecticide concentration.

BIBLIOGRAFIE

1. R.H. Burris, in *Encyclopedia of Plant Physiology*, **XII**, Part 1, 365–393 (1960).
2. D. Hess, Z. Pflanzenphysiol, **56**, 295 (1967).
3. V. Macko, A. Novacky, Biologia (Bratislava) **21**, 128 (1966).
4. Waltrand, Rücker Radola Bertoldy, Planta, **99**, 192 (1971).
5. G.L. Farkas, M.A. Stahmann, Phytopathology, **56**, 669 (1966).
6. R. Ockorse, B.Z. Siegel, A.W. Galston, Science, **151**, 452 (1966).
7. B.Z. Siegel, A.W. Galston, Plant Physiol, **42**, 221 (1967).
8. E. Kay, M.L. Shannon, J.Y. Lew, J. biol. chem. **242**, 2470 (1967).

9. D.C. McCune, Ann. N.Y. Acad. Sci., **94**, 723 (1961).
10. V. Alexandrescu, I. Hagima-Călin, St. cerc. biochim., **13**, 113 (1970).
11. H.F. Fehrmann, A.E. Dimond, Phytopathology, **57**, 69 (1967).
12. A. Reus, An. şt. Univ. Iaşi, S. II. A. biol., **18** fasc. 2 (1972).
13. R.C. Staples, M.A. Stahmann, Phytopathology, **54**, 760 (1964).
14. O. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, J. biol. chem., **193**, 265 (1951).
15. D. Tănăsescu, N. Moldoveanu, St. cerc. biochim., **13**, 313 (1968).
16. D. Vanickova, Biologia (Bratislava), **24**, 906 (1969).
17. C. Manolache, A. Săvescu, Gh. Boguleanu, Fl. Paulian, D. Balan, P. Paşol, *Entomologie agricolă*, Edit. agricolă, Bucureşti, (1969).

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 1, 29–34 (1973)

ELECTROFOREZA ÎN GEL DE POLIACRILAMIDĂ A PROTEINELOR ÎN EMBRIOGENEZĂ LA *CYPRINUS CARPIO, HYPOPHTHALMICHTHYS MOLITRIX* ŞI *CTENOPHARINGODON IDELLA*

VALENTINA JURCĂ, GABRIELA CAZACU şi CONSTANTIN CAZACU

Rezumat. — S-au cercetat proteinele solubile în embriogeneză la speciile *Cyprinus carpio*, de la stadiul de ou nefecundat pînă la stadiul de după eclozare. Se descriu o serie de caracteristici referitoare la eterogenitatea, mobilitatea electroforetică şi raporturile cantitative dintre diferitele tipuri de proteine în cursul dezvoltării embrionare la speciile cercetate.

Studiul proteinelor în cursul dezvoltării embrionare a fost făcut în special în ce priveşte dezvoltarea vertebratelor superioare. Cunoştinţele referitoare la această problemă în cazul dezvoltării peştilor sînt foarte restrînse şi fragmentare. Cercetările efectuate pe oul de păstrăv de către Tangl şi Farkas [citat de 1] se referă la azotul total, înainte de incubaţie şi la sfîrşitul incubaţiei. Alte cercetări [2] au urmărit azotul total în cursul primei părţi a dezvoltării, la păstrăv şi crap.

Pornind de la aceste considerente şi de la faptul că proteinele sînt elementele principale ce stau la baza ontogenezei, ne-am propus studiul lor electroforetic în embriogeneză, la trei specii de cyprinide : *Cyprinus carpio* (crapul autohton), *Hypophthalmichthys molitrix* şi *Ctenopharyngodon idella*. Ultimele două specii de peşti, originare din apele Chinei, sînt în curs de aclimatizare în apele ţării noastre, cu scopul valorificării la maximum a unor niveluri trofice diferite de ale crapului.

MATERIAL ŞI METODĂ

Cercetările s-au efectuat pe extractele proteice ale probelor biologice de la icre nefecundate pînă la stadiul de după eclozare. Materialul biologic a fost recoltat la staţiile de reproducere artificială din Delta Dunării. Stadiile de dezvoltare morfologice au fost stabilite microscopic. Imediat după recoltare, probele biologice au fost congelate.

Extracţia proteinelor s-a făcut timp de 3 ore în soluţie de zaharoză 0,3 M în Tris-HCI 0,04 M, pH = 7,5, la +4°C, din materialul biologic decongelat, care în prealabil a fost centrifugat 25 min la 5 000 rot/min (+4°C), tamponat cu hîrtie de filtru şi cîntărit. Raportul de extracţie a fost două părţi greutate material de cercetat şi o parte soluţie extractant. Omogenatele obţinute s-au centrifugat la 8 000 rot/min timp de

20 min, iar pentru electroforeză s-a utilizat supernatant conţinînd 400γ proteină. Proteinele din supernatant au fost determinate prin metoda Lowry [3].

Electroforeza în gel de poliacrilamidă a proteinelor s-a efectuat vertical, în strat subţire, după tehnica descrisă de Ahroyd [4], cu modificările aduse de Tănăsescu şi Moldoveanu [5]. Concentraţia gelului a fost de 7% şi s-a utilizat tamponul Tris-borat-EDTA, pH = 7,15. S-a lucrat la 25 mA şi 300 V, timpul de migrare fiind de 3 ore. Fracţiunile proteice au fost revelate cu o soluţie de amidoschwarz 0,5% în acid acetic 7%. Decolorarea s-a făcut prin spălări succesive cu acid acetic 7%.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În tabela 1 redăm concentraţia proteică a extractelor probelor biologice în cursul dezvoltării la *Cyprinus carpio*, *Hypophthalmichthys molitrix* şi *Ctenopharyngodon idella*.

Tabela 1

Concentraţia proteică a extractelor probelor biologice în cursul dezvoltării embrionare la *Cyprinus carpio* la *Hypophth almichthys molitrix* (I) şi la *Ctenopharyngodon idella* (II) (g/1000 ml extractant)

Stadiul de dezvoltare	Proteine g/1 000 ml	
CYPRINUS CARPIO		
Icre nefecundate	25,45	
Icre fecundate (15 min)	27,02	
Discoblastulă	28,62	
Gastrulă	26,45	
Embrion cu ochi negri	20,07	
Larve la eclozare (72 de ore)	23,15	
HYPOPHTHALMICHTHYS MOLITRIX (I) şi CTENOPHARYNGODON IDELLA (II)	(I)	(II)
Icre nefecundate	15,52	11,74
Icre fecundate (1 min)	16,76	12,98
Icre fecundate (20 min)	16,23	12,49
Blastulă (5 ore)	15,72	11,84
Gastrulă (10 ore)	15,12	10,01
Apariţia cupelor optice (18 ore)	12,17	9,28
Embrion gata de eclozare	12,09	9,01
Embrion imediat după eclozare	13,89	10,73

Rezultatele reprezintă media a trei determinări

Se observă variaţii în concentraţia proteică a extractelor, în funcţie de stadiul dezvoltării morfologice şi în funcţie de specie.

Modelele electroforetice ale proteinelor în embriogeneză la *Cyprinus carpio* sînt prezentate în figura 1, la *Hypophtalmichthys molitrix* în figura 2 şi la *Ctenopharyngodon idella* în figura 3.

Proteinele în cursul dezvoltării embrionare prezintă o serie de particularităţi referitoare la eterogenitatea, mobilitatea în cîmp electric şi la raporturile cantitative dintre diferitele tipuri de componente.

Proteinogramele aparţinînd stadiilor de dezvoltare embrionară la speciile cercetate evidenţiază grade de eterogenitate variate. Astfel, spectrul electroforetic al icrelor nefecundate (fig. 1 *a*) de *Cyprinus carpio* se compune din 14 fracţiuni, număr care se menţine şi în stadiul de după fecundare (fig. 1 *b*). În stadiul de discoblastulă (fig. 1 *c*) şi în stadiul de gastrulă (fig. 1 *d*) s-au evidenţiat 12 fracţiuni. În stadiul de embrion cu ochi (fig. 1 *e*) 11 fracţiuni şi în stadiul de larvă la eclozare (fig. 1 *f*) 13 fracţiuni proteice. Proteinogramele aparţinînd celor două specii de peşti *Hypophalmichthys molitrix* (fig. 2) şi *Ctenopharyngodon idella* (fig. 3) manifestă un paralelism destul de marcat. În stadiul de ou nefecundat (fig. 2 *a*—3*a*) s-au relevat 10 fracţiuni, de asemenea şi în stadiul de după fecundare, la un minut (fig. 2*b*—3*b*) şi la 20 min (fig. 2*c*—3*c*). În stadiile de blastulă (fig. 2*d*—3*d*) şi gastrulă (fig. 2*e*—3*e*) şi în stadiul de apariţie a cupelor optice (fig. 2*f*—3*f*) s-au separat la electroforeză 8 fracţiuni proteice. În stadiile de embrion gata de eclozare (fig. 2*g*—3*g*) şi imediat după eclozare (fig. 2*h*—3*h*) s-au relevat 9 fracţiuni proteice. Diversificarea cantitativă şi calitativă a proteinelor în cursul dezvoltării embrionare poate fi corelată cu înseşi modificările morfostructurale ale dezvoltării embrionului, ca expresie a evoluţiei sale.

Din punct de vedere al migrării electroforetice şi al raporturilor cantitative dintre diferitele tipuri de proteine, în cursul embriogenezei speciilor cercetate, nu se pot stabili criterii precise. Se constată însă ca o trăsătură comună tuturor speciilor, prezenţa unor fracţiuni majore în intervalul cu mobilitate anodică mai mică, situate în imediata vecinătate a startului. În stadiile finale ale dezvoltării embrionare, fracţiunile proteice majore au un domeniu de migrare anodică relativ mai mare în com-

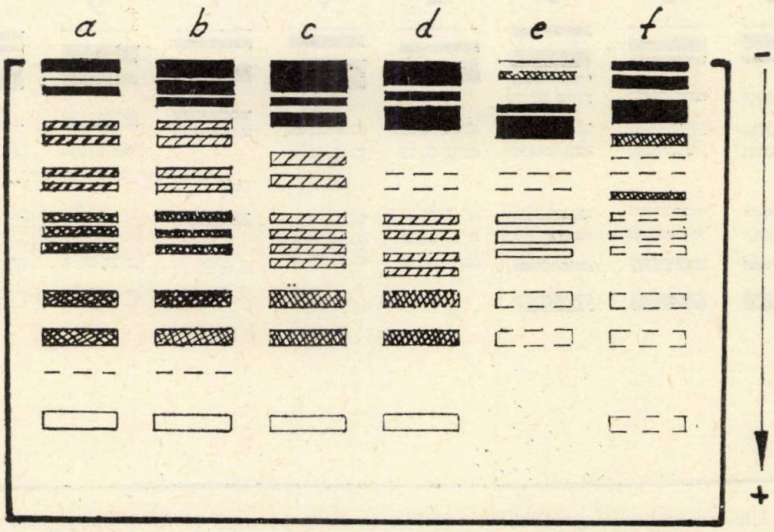


Fig. 1. Electroforegrama proteinelor solubile în embriogeneză la *Cyprinus carpio*.

a — icre nefecundate; *b* — stadiul de icre fecundate (15 min); *c* — stadiul de discoblastulă; *d* — stadiul de gastrulă; *e* — stadiul de embrion cu ochi negri; *f* — stadiul de larvă la eclozare (72 ore).

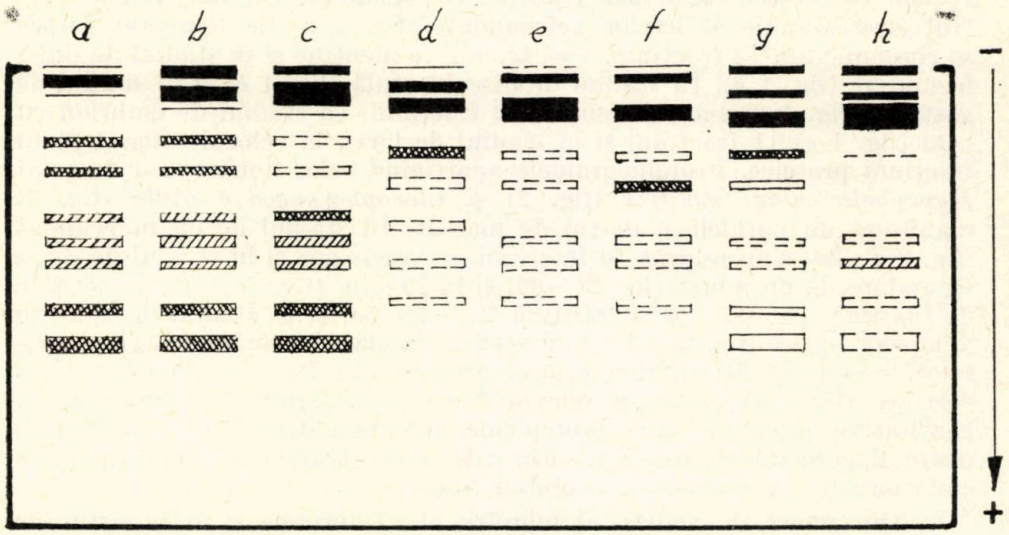


Fig. 2. Electroforegrama proteinelor solubile în embriogeneză la *Hypophthalmichthys molitrix*.
a – icre nefecundate; *b* – icre fecundate (1 min); *c* – icre fecundate (20 min); *d* – stadiul de blastulă (5 ore); *e* – stadiul de gastrulă (10 ore); *f* – stadiul de apariție a cupelor optice (18 ore); *g* – stadiul de embrion gata de eclozare; *h* – stadiul de embrion imediat după eclozare.

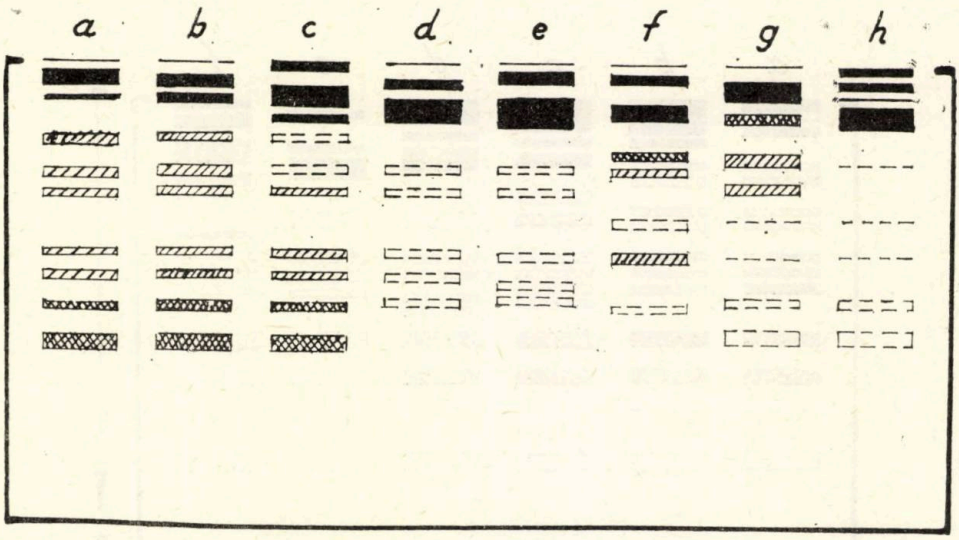


Fig. 3. Electroforegrama proteinelor solubile în embriogeneză la *Ctenopharyngodon idella*.
a – icre nefecundate; *b* – icre fecundate (1 min); *c* – icre fecundate (20 min); *d* – stadiul de blastulă (5 ore); *e* – stadiul de gastrulă (10 ore); *f* – stadiul de apariție a cupelor optice (18 ore); *g* – stadiul de embrion gata de eclozare; *h* – stadiul de embrion imediat după eclozare.

paraţie cu primele stadii de dezvoltare. Fracţiunile proteice cu migrare anodică mai rapidă scad în intensitate pe măsura dezvoltării embrionare. Cercetările întreprinse de Smith [citat de 1], la embrionii de salmonide, au pus în evidenţă că după eclozare nivelul proteinelor scade. Fracţiunile cu mobilităţi intermediare au o distribuţie diferită, în funcţie de specie, diferenţierea apărînd evidentă chiar şi între speciile *Ctenopharyngodon idella* şi *Hypophthalmichthys molitrix*, ale căror proteinograme manifestă un grad mai mare de omogenitate interspecii.

Trebuie subliniat faptul că modificarea tabloului electroforetic al proteinelor în embriogeneză se face observată la cele trei specii de cyprinide încă din stadiul de fecundare şi se accentuează progresiv cu diferenţierea morfologică a dezvoltării embrionului (fig. 1, 2 şi 3). Modelele electroforetice ale proteinelor în embriogeneza celor trei specii de cyprinide prezintă, pe lîngă unele aspecte comune, şi o specificitate de specie mai mult sau mai puţin accentuată, atît în ceea ce priveşte eterogenitatea, cît şi în ceea ce priveşte mobilitatea electroforetică şi raporturile cantitative dintre diferitele tipuri de proteine. Toate aceste caracteristici reflectă relaţii de unitate şi diversitate, intra- şi interspecii, pe planul evoluţiei biochimice în ontogeneză.

CONCLUZII

Proteinele solubile în embriogeneza speciilor *Cyprinus carpio*, *Hypophthalmichthys molitrix* şi *Ctenopharyngodon idella* prezintă, pe lîngă unele trăsături comune, şi variaţii referitoare la eterogenitatea, mobilitatea electroforetică şi a raporturilor cantitative dintre diferitele tipuri de proteine, în funcţie de specie şi de stadiile dezvoltării embrionare.

Prezentat la redacţie la 20 aprilie 1972

Universitatea „Al. I. Cuza" Iaşi
Laboratorul de biochimie
şi
Institutul de cercetări şi proiectări pentru
Delta Dunării-Tulcea

BIBLIOGRAFIE

1. V. Preda, *Biochimia dezvoltării embrionare la vertebrate*, Bucureşti, Edit. Academiei, 1969, p. 61.
2. V. Preda, E. Ţiu, St. cerc. biol. (Cluj), **10**, 315 (1959).
3. O. Lowry, N. J. Rosebrough, A. Lewis-Farr, R. J. Randall J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951).
4. L.P. Ahroyd, Anal. Biochem., **19**, 399 (1967).
5. D. Tănăsescu, N. Moldoveanu, St. cerc. biochim., **11**, 313 (1968).

POLYACRILAMIDE GEL ELECTROPHORESIS OF PROTEINS DURING EMBRIOGENESIS OF *CYPRINUS CARPIO, HYPOPHTHALMICHTHYS MOLITRIX* AND *CTENOPHARYNGODON IDELLA*

SUMMARY

The soluble proteins of the following species: *Cyprinus carpio*, *Hypophthalmichthys molitrix* and *Ctenopharyngodon idella*, in embriogenesis stage, present, besides some common features and certains variations as regards heterogeneity, electrophoretic mobility and quantitative ratios between different types of proteins, depending on species and its embryonic developmental stage.

ST. CERC. BIOCHIM., **16**, *1*, 35–43 (1973)

CONTRIBUȚII LA BIOSINTEZA CAROTENOIDELOR. V. BIOSINTEZA CAROTENOIDELOR DIN *AESCULUS RUBICUNDA* AUCT.

GAVRIL NEAMȚU și CORNEL BODEA

Rezumat. — S-au cercetat pigmenții carotenoidici din frunze, muguri florali și flori de *Aesculus rubicunda* Auct.

Dintre elementele florale, în anterele cu polen s-a identificat un număr mare de carotenoide, în special ceto-hidroxi-carotenoide care au în moleculă inele cu structură pentaciclică. Pigmenții principali sînt capsantina, capsantona, capsorubina și β-carotina, alături de care s-au identificat și alte carotenoide. În polen s-a pus în evidență 4-ceto-capsantina, ce reprezintă o nouă ceto-hidroxi-carotenoidă naturală, care prin reducere cu borohidrură de sodiu formează 3,4,6′, 3′-tetrahidroxi-capsantina, care de asemenea reprezintă o nouă carotenoidă, obținută prin semisinteză.

Din rezultatele obținute cu privire la dinamica biosintezei pigmenților carotenoidici la această specie reiese că principalele ceto-hidroxi-carotenoide iau naștere în țesuturile care formează anterele cu polen, din mugurii florali.

În continuarea cercetărilor noastre privind cunoașterea dinamicii biosintezei pigmenților carotenoidici la plante superioare, ne-am ocupat de pigmenții carotenoidici din *Aesculus rubicunda* Auct., plantă care pînă în prezent nu a fost studiată sub acest aspect și care prezintă o carotenogeneză bogată în polen.

Dintre puținele specii din genul *Aesculus* care se cultivă în țara noastră, în parcuri și grădini publice, ca plante lemnoase ornamentale, face parte și *Aesculus rubicunda*, care este un copac înalt de aproximativ 8–12 m, cu numeroase flori de culoare roșietică, grupate în inflorescențe piramidale [1].

Polenul are o culoare portocalie-roșietică, caracteristică ceto-carotenoidelor, fapt ce ne-a determinat să cercetăm pigmenții carotenoidici din această specie. Menționăm că pînă în prezent se cunosc puține plante care să conțină ceto-carotenoide în polen [2–6].

MATERIAL ȘI METODE

Pentru determinarea pigmenților carotenoidici s-a folosit material proaspăt și conservat (frunze, muguri florali și flori), recoltat în anii 1969–1972 de pe arbori de *Aesculus rubicunda* din municipiul Cluj.

Conservarea materialului vegetal, în special a polenului, s-a făcut în eter de petrol, în vase ermetic închise.

Extragerea pigmenților carotenoidici s-a făcut cu amestec de eter de petrol — acetonă — metanol (6 : 3 : 1). Pentru separarea și purificarea carotenoidelor s-a folosit în cea mai mare parte cromatografia pe coloană, utilizînd ca adsorbant carbonatul de calciu și un amestec de oxid de magneziu cu nisip fin. Coloanele adsorbante s-au developat cu un amestec de eter de petrol — benzen — acetonă, în raport de 6 : 3 : 1. Pentru verificarea purității pigmenților și pentru cromatograme de amestec s-a folosit și cromatografia în strat subțire, utilizînd ca adsorbant oxidul de magneziu, iar ca developant amestecul de etanol—cloroform—eter de petrol 1 : 2 : 7.

Cromatogramele de amestec s-au făcut cu carotenoide naturale extrase din *Capsicum annuum* (fructe roșii și boia) și din *Aesculus hippocastanum*.

Reducerea carotenoidei I s-a făcut prin tratarea a 10 mg pigment dizolvat în 24 ml amestec de eter etilic — etanol 2 : 1, cu 0,250 mg borohidrură de sodiu, timp de 80 de minute, la întuneric și la temperatura camerei.

Acetilarea pigmentului I s-a făcut prin tratarea a 6 mg pigment, dizolvat în 3 ml piridină uscată, cu 0,02 ml anhidridă acetică, timp de 24 de ore, la temperatura camerei.

Saponificarea pigmenților din polen s-a făcut cu soluție etanolică de hidroxid de potasiu 8%, timp de 45 de minute, la 40°C.

Identificarea și determinarea pigmenților carotenoidici s-au făcut prin aceleași metode ca și în lucrările anterioare [6], [7].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Conținutul pigmenților carotenoidici din frunzele în creștere se prezintă în tabela 1.

Tabela 1

Conținutul de carotenoide foliare din *Aesculus rubicunda*, în mg/100 g frunze proaspete

Carotenoide	Frunze de :				
	o zi	10 zile	20 zile	30 zile	40 zile
α-Carotina	0,18	0,32	0,38	0,46	0,48
β-Carotina	0,54	0,63	0,79	0,96	1,04
Criptoxantina	0,10	0,14	0,20	0,26	0,28
Luteina	1,58	1,50	1,34	1,25	1,27
Zeaxantina	0,06	0,09	0,13	0,15	0,18
Violaxantina	0,65	0,60	0,52	0,46	0,42
Pigmenți chinonici	3,10	2,80	2,35	1,83	1,67

În frunzele de *Aesculus rubicunda*, pe lîngă carotenoidele arătate în tabel, se găsesc și pigmenți chinonici [8], de culoare galbenă, foarte puternic reținuți pe coloana adsorbantă. În timpul dezvoltării frunzelor

se produce o ușoară creștere a α-carotinei, β-carotinei, zeaxantinei și a criptoxantinei, în timp ce restul pigmenților scade sub aspect cantitativ. Frunzele tinere au o culoare verde-gălbuie, iar cele mature o culoare verde închis.

Culoarea verde-gălbuie a frunzelor tinere credem că este determinată și de existența în cantitate mai mare a luteinei, violaxantinei și a pigmenților chinonici, care au cu toții o culoare galbenă.

Din determinările efectuate se constată că odată cu creșterea frunzelor se produc schimbări și în ce privește conținutul și raportul dintre carotenoide.

În frunzele de *Aesculus rubicunda* α-carotina se găsește în cantitate relativ mare, și astfel frunzele acestei specii pot constitui o sursă importantă pentru extragerea α-carotinei.

S-au determinat pigmenții carotenoidici și din frunzele de 60, 90, 120, 150 și 180 de zile, în anii 1969—1971. În frunzele de 60—120 de zile proporția carotenoidelor este aceeași ca și în frunzele de 40 de zile. În frunzele de 150—180 de zile se produce o scădere a carotenoidelor hidrocarburice și o creștere a xantofilelor și a epoxizilor. Acest proces se intensifică pe măsură ce frunzele îmbătrînesc. În frunzele de aproximativ 210 zile (recoltate în luna octombrie) s-au identificat următoarele carotenoide : α-carotina 0,02 mg, β-carotina 0,41 mg, criptoxantina 0,36 mg, luteina 2,27 mg, zeaxantina 0,24 mg și violaxantina 0,58 mg la 100 g material proaspăt.

Odată cu apariția frunzelor apar și se dezvoltă și mugurii florali, dispuși în inflorescențe piramidale.

Pentru a putea urmări dinamica proceselor de carotenogeneză și corelația dintre carotenoide în timpul creșterii și dezvoltării mugurilor, s-au determinat pigmenții carotenoidici din mugurii florali în diferite faze de creștere. Determinările cantitative se prezintă în tabela 2.

Tabela 2

Conținutul de carotenoide din mugurii florali de *Aesculus rubicunda*, în diferite faze de dezvoltare (în mg/100 g material proaspăt)

Carotenoide	Muguri nedezvoltați, de 2—3 zile	Muguri dezvoltați, de 7—8 zile	Muguri înainte de înflorire, de 14—15 zile
α-Carotina	0,16	0,19	0,12
β-Carotina	1,24	1,56	1,08
Criptoxantina	0,18	0,26	0,10
Luteina	1,62	1,34	1,23
Zeaxantina	0,14	0,26	0,18
Anteraxantina	0,10	0,18	0,09
Violaxantina	0,21	0,28	0,16
Criptocapsina	—	—	0,06
Criptocapsona	—	—	urme
Capsantina	0,14	0,24	1,60
Capsantinmonoepoxid	0,06	0,17	0,24
Capsantona	0,09	0,23	0,86
4-Ceto-capsantina	—	—	urme
Capsorubina	0,08	0,19	0,38
Capsorubonă	—	—	urme

Din analizele efectuate reiese că în mugurii florali nedezvoltați se găsesc atît carotenoidele care se întîlnesc în frunze (α-carotina, β-carotina, criptoxantina, luteina, zeaxantina, violaxantina), cît și principalele carotenoide din polen (capsantina, capsantinmonoepoxid, criptoxantonă, capsorubina etc.). În muguri apare și anteraxantina, care nu s-a identificat nici în frunze și nici în polen.

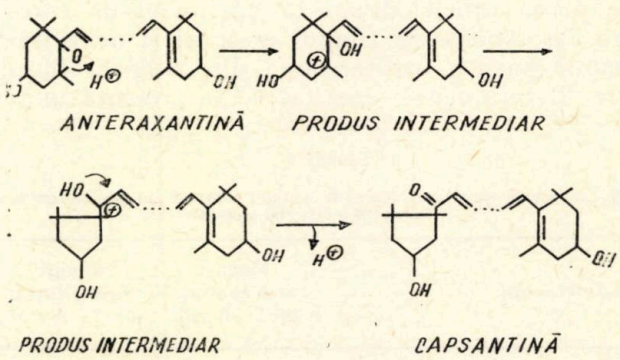
Analizînd conținutul de carotenoide din mugurii florali în diferite faze de creștere, se observă că odată cu dezvoltarea lor se produce scăderea carotenoidelor foliare și o creștere a carotenoidelor florale. Din această corelație se poate presupune că o parte din carotenoidele foliare, care se găsesc în muguri, contribuie la formarea carotenoidelor florale. Carotenoidele foliare au în moleculă inele cu structură hexaciclică, iar majoritatea celor din flori au în moleculă inele cu structură pentaciclică.

Transformarea carotenoidelor cu inele hexaciclice în carotenoide cu inele pentaciclice se face prin izomeria retropinacolică [9—14].

Mecanismul posibil de transformare a anteraxantinei (cu inel hexaciclic) în capsantină (cu inel pentaciclic) se prezintă în schema 1 [15].

SCHEMA 1

MECANISMUL POSIBIL DE TRANSFORMARE A ANTERAXANTINEI ÎN CAPSANTINĂ



Existența anteraxantinei și a capsantinei în mugurii florali ar putea constitui un argument pentru confirmarea mecanismului prezentat în schema 1.

Cu siguranță că pigmenții carotenoidici florali se pot forma nu numai din carotenoidele foliare, ci și din alți precursori.

S-au determinat, de asemenea, pigmenții carotenoidici din flori, separat pe elemente florale, deci din sepale, petale, stamine și pistil. În sepale s-au identificat aceleași carotenoide ca și în frunze, deosebirile fiind mici și nesemnificative. În petale, care au o culoare roșietică, cu pete portocalii spre interior (la maturitate), s-au pus în evidență β-carotina, criptoxantina, luteina, pigmenți chinonici, antociani și un pigment vio-

laceu neidentificat. În filamentele staminelor şi în pistil s-au identificat β-carotina, luteina, pigmenţi chinonici şi principalele carotenoide din polen, dar în cantitate foarte mică.

Determinarea pigmenţilor carotenoidici din anterele cu polen se prezintă în tabela 3.

Tabela 3

Cromatograma şi conţinutul de carotenoide din anterele cu polen de *Aesculus rubicunda* (în mg/100 g material proaspăt)

Lăţimea zonei în cm	Culoarea	Pigmentul carotenoidic	Maximele de absorbţie, în eter de petrol, în nm	Cantitatea în mg/100 g
1,8	galben-cărămiziu	neidentificat	492, 456	4,20
0,8	violet-cărămiziu	neidentificat	496, 459	0,76
1,0	interzonă			
0,2	albastru-violet	capsorubonă	512, 481, 456	0,34
0,1	violet	neidentificat	510, 480, 460	0,25
0,6	violet	capsorubină ester	507, 476, 451	0,83
1,5	interzonă			
0,3	violet	4-ceto-capsantină ester	508, 475, 450	0,42
1,2	violet-albăstrui	capsantonă ester	505, 472, 446	1,46
0,5	roşu-cărămiziu	capsantinepoxid ester	496, 468, 445	0,85
2,4	roşu-violaceu	capsantină ester	500, 468, 443	4,27
0,2	roşu-cărămiziu	neidentificat	498, 465, 477	0,29
0,5	interzonă			
0,7	portocaliu-violaceu	criptocapsonă ester	491, 477, 467	0,72
0,6	portocaliu-roşietic	criptocapsină ester	486, 472, 462	0,67
0,5	interzonă			
0,5	portocaliu	zeaxantină ester	478, 448	0,56
0,3	interzonă			
0,3	galben	luteină ester	474, 444	0,33
0,5	interzonă			
0,4	portocaliu	criptoxantină ester	478, 448	0,49
3,0	interzonă			
1,4	portocaliu	β-carotină	478, 447	0,96

Din determinările efectuate reiese că, la această specie, anterele cu polen constituie partea cea mai bogată în carotenoide.

Ca un aspect caracteristic apare predominarea carotenoidelor care au în moleculă inele cu structură pentaciclică, faţă de acelea ale căror inele iononice au structură hexaciclică. Pigmenţii principali sînt capsantina, capsantona, capsorubina şi β-carotina, alături de care s-au identificat criptoxantina, luteina, zeaxantina, precum şi pigmenţi mai rar întîlniţi în natură, cum sînt: criptocapsina, criptocapsona, capsantin-monoepoxidul şi capsorubona. Tot în polen s-a identificat şi 4-ceto-capsantina (I) ce reprezintă o nouă ceto-hidroxi-carotenoidă naturală.

Structura 4-ceto-capsantinei s-a determinat pe baza următoarelor date:

— Spectrul de absorbţie prezintă în vizibil maxime la 508, 475, 450 nm, cu 7—8 nm mai mari decît maximele de absorbţie ale capsantinei, indicînd prin aceasta că gruparea cetonică de la C_4 se găseşte în poziţie alilică faţă de lanţul polienic, probabil pe inelul β-iononic [16—18]. Dacă gruparea cetonică de la C_4 ar fi pe inelul pentaciclic sau pe catena internă, spectrul de absorbţie ar avea maxime mai mici.

Maximele spectrelor de absorbţie în vizibil ale carotenoidelor care au în moleculă grupări cetonice pe inelele pentaciclice sau pe catena

internă, față de carotenoidele omoloage care au grupări hidroxilice, în poziții similare grupărilor cetonice, cum sînt: criptocapsonă-criptocapsină, capsantonă-capsantină, capsorubonă-capsorubină, sînt mai mari în medie cu numai 4—5 nm pentru fiecare grupare cetonică [19].

Structura fină a spectrului de absorbție este accentuată ca și structura fină a capsantinei [10] și ca și a ceto-hidroxi-carotenoidelor din ciuperci [17].

— Spectrul de absorbție în IR prezintă maxime în regiunea 970 cm^{-1} (disubstituenți la trans duble legături), 1 050 cm^{-1} (ester la OH secundar), 1 120, 1 180, 1 200, 1 310 cm^{-1} (ester C—O—), 1 380 cm^{-1} (dimetili gemeni), 1 470 cm^{-1} (CH_2), 1 520 (duble legături conjugate), 1 615 cm^{-1} (carbonilul de la C_4), 1 680 cm^{-1} (ceto-carotenoidă cu inel pentaciclic), 1 740 cm^{-1} (ester saturat), 2 850, 2 930 cm^{-1} (CH), 3 600 cm^{-1} (OH liber apărut după saponificare [20—21].

Carbonilul de pe inelul hexaciclic prezintă un maxim de absorbție la o frecvență mai joasă, asemănător astacinei, datorită, probabil, legăturii de hidrogen ce se formează între gruparea hidroxilică de la C_3 și gruparea carbonilică de la C_4.

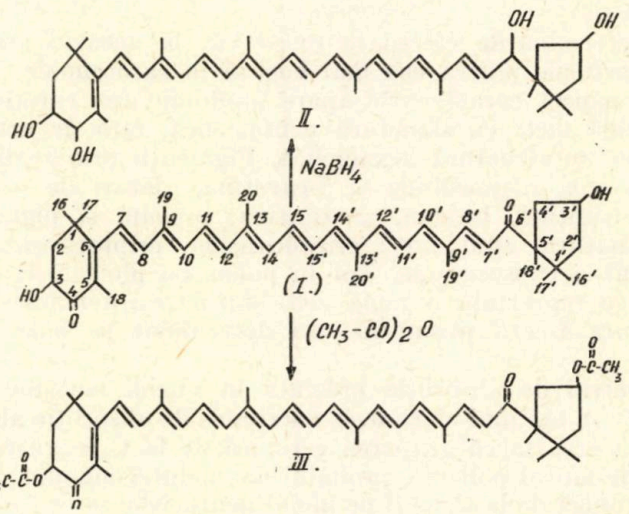
— Prin reducerea 4-ceto-capsantinei (I) se obține 3, 4, 6', 3'-tetrahidroxi-capsantina (II), care reprezintă o nouă carotenoidă semisintetică.

Reducerea și acetilarea pigmentului I se prezintă în schema 2.

SCHEMA 2

REDUCEREA ȘI ACETILAREA 4-CETO-CAPSANTINEI

(I)



Pigmentul II prezintă maxime de absorbție în vizibil la 493, 460, 435 nm; are culoare galben-cărămizie pe coloana adsorbantă; punctul

de topire la 148°C și repartiție hipofazică de 100 % în eter de petrol-metanol 95%. Pe coloana adsorbantă este mai puternic reținut decît pigmentul I.

— Pigmentul I are pe coloana adsorbantă o culoare violetă și este mai puternic adsorbit decît capsantina. Are punctul de topire la 170°C (luat la aparatul Boëtius) și prezintă repartiție hipofazică de 80% în eter de petrol-metanol 95%.

Dacă gruparea cetonică de la C_4 a pigmentului I ar fi pe inelul pentaciclic sau pe catena internă, atunci deplasarea hipsocromă a spectrului de absorbție al pigmentului II ar fi trebuit să fie mai mică [19].

— Într-un amestec de eter de petrol-metanol 95%, 4-ceto-capsantina prezintă un inel violaceu, caracteristic ceto-carotenoidelor.

Prin acetilare cu anhidridă acetică, 4-ceto-capsantina trece în diesterul corespunzător (III), vezi schema 2.

Ceto-hidroxi-carotenoidele din anterele cu polen se găsesc sub formă de ester. Prin saponificare, o parte din pigmenți trec în hipofază (datorită formării sării solubile de potasiu), iar după acidularea mediului, pînă la un pH acid, pigmenții trec în epifază. Din hipofază, ceto-hidroxi-carotenoidele pot trece în epifază și prin utilizarea eterului etilic.

Din cercetările efectuate reiese că *Aesculus rubicunda* face parte dintre puținele plante cunoscute pînă în prezent, care au un număr mare de carotenoide în polen.

În polenul acestei specii, la fel ca și în cel de *Aesculus hippocastanum*, se găsesc un mare număr de ceto-hidroxi-carotenoide, de tipul celor care se găsesc în *Capsicum annuum* [10—14], deși între genul *Aesculus* și genul *Capsicum* nu există nici o înrudire filogenetică.

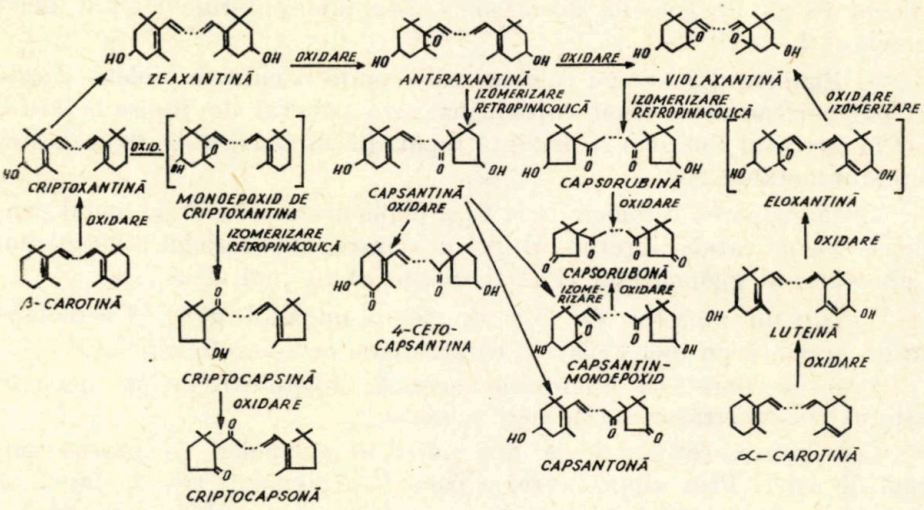
Prezența ceto-hidroxi-carotenoidelor de tipul capsantinei în polenul speciilor de *Aesculus* ar putea constitui un criteriu chemotaxonomic pentru întregul gen.

Pe baza pigmenților carotenoidici identificați în frunze, muguri florali și polen, și ținînd seama de interconversiunea carotenoidelor, propunem o schemă probabilă de biosinteză a carotenoidelor din polenul de *Aesculus rubicunda*.

În procesul de biosinteză a ceto-hidroxi-carotenoidelor pot să participe unele carotenoide intermediare, care n-au fost puse în evidență în materialul de cercetat. Astfel, transformarea luteinei în violaxantină se face, probabil, treptat, prin intermediul eloxantinei, și nu în mod direct. Criptoxantina se transformă, probabil, în criptocapsină, prin intermediul monoepoxidului de criptoxantină.

Pigmenții prezentați în cromatograme, dar neidentificați, ar putea de asemenea să apară ca produși intermediari în procesul de formare a ceto-hidroxi-carotenoidelor cu mai multe grupări cetonice și hidroxilice în moleculă.

SCHEMA 3



SCHEMA BIOSINTEZEI PIGMENȚILOR CAROTENOIDICI DIN AESCULUS RUBICUNDA

CONCLUZII

Aesculus rubicunda se caracterizează printr-un conținut mare de carotenoide în anterele cu polen. Sub aspect cantitativ predomină ceto-hidroxi-carotenoidele de tipul capsantinei, care au în moleculă inele cu 5 atomi de carbon. Pigmenții principali sînt capsantina, capsantona, capsorubina și β-carotina, alături de care s-au identificat și alte carotenoide care au în moleculă inele pentaciclice și hexaciclice.

În polen s-a identificat, de asemenea, 4-ceto-capsantina, care este o nouă ceto-hidroxi-carotenoidă naturală. Acest pigment, prin reducere cu borohidrură de sodiu, formează 3, 4, 6′, 3′-tetra-hidroxi-capsantina, o nouă carotenoidă obținută prin semisinteză.

Pigmenții carotenoidici din frunze, muguri florali și flori sînt însoțiți de pigmenți chinonici.

Pe baza pigmenților identificați în frunze, muguri florali și flori, se propune o schemă de biosinteză a pigmenților carotenoidici din polen.

Prezentat la redacție la 13 mai 1972

Catedra de biochimie
Institutul agronomic „Dr. Petru Groza"
Cluj

ON THE BIOSYNTHESIS OF CAROTENOIDS. V. BIOSYNTHESIS OF CAROTENOIDS IN *AESCULUS RUBICUNDA* AUCT.

SUMMARY

Carotenoids from leaves, flower-buds and flowers of *Aesculus rubicunda* Auct. were investigated.

The anthers with pollen contain a large number of carotenoids, especially keto-hydroxy-carotenoids with pentanuclear rings. The main pigments are capsanthin, capsanthone, capsorubin and β-carotene. Among the minor carotenoids in the pollen a new keto-hydroxy-carotenoid was found, to which the structure 4-keto-capsanthin was attributed; on reduction with sodium-boronhydride it resulted 3, 4, 6′, 3′-tetrahydroxy-capsanthin, representing a new semi-synthetical carotenoid.

From dynamical studies of carotenoid biosynthesis in this species, it was concluded that the main keto-hydroxy-carotenoids are formed in the anthers of flower-buds.

BIBLIOGRAFIE

1. T. Săvulescu, *Flora Republicii Populare Române*, vol. 6, Bucureşti, Edit. Academiei, 1958, p. 248.
2. P. Karrer, A. Oswald, Helv. Chim. Acta, **18**, 1303 (1935).
3. P. Karrer, C.H. Eugster, M. Faust, Helv. Chim. Acta, **33**, 300 (1950).
4. P. Karrer, E. Leumann, Helv. Chim. Acta, **34**, 1412 (1951).
5. A. Sykut, Bull. Acad. Polon. Sci. Ser., **XIII**, 5 (1965).
6. G. Neamţu, Gh. Illyes, C. Bodea, St. cerc. biochim., **12**, 77 (1969).
7. G. Neamţu, C. Bodea, St. cerc. biochim., **14**, 419 (1971).
8. A.R. Welbrune, F.W. Hemming, Biochem. J., **104**, 173 (1967).
9. R. Entschel, P. Karrer, Helv. Chim. Acta, **43**, 89 (1960).
10. M.S. Barber, L.M. Jackman, C.K. Warren, B.C.L. Weedon, J. Chem. Soc., 4019 (1961).
11. J.W. Faigle, H. Müller, W. von Philipshorn, P. Karrer, Helv. Chim. Acta, **47**, 471 (1964).
12. L. Cholnoky, D. Szabő, J. Szabolcs, Ann. Chem., **606**, 194 (1957).
13. L. Cholnoky, J. Szabolcs, Experientia, **16**, 483 (1960).
14. B.C.L. Weedon, Chem. in Britain, **3**, 424 (1967).
15. T.W. Goodwin, *Biosynthesis*, Citat din *Carotenoids* de O. Isler, (Ed. Birkhäuser Verlag Basel und Stuttgart, 1971, p. 607.
16. M.S. Bamji, N.I. Krinsky. Biochim. Biophys. Acta, **115**, 276 (1966).
17. N. Arpin, S.L. Jensen, Bull. Soc. Chim. Biol., **49**, 527 (1967).
18. S.L. Jensen, Pure Appl. Chem., **14**, 227 (1967).
19. H.M. Rauen, *Biochemisches Taschenbuch*, vol. 1, Edit. Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1964, p. 366.
20. S. Hertzberg, S.L. Jensen, C. Enzell, G.W. Francis, Acta. Chem. Scand., **23**, 3 290 (1969).
21. B.C.L. Weedon, *Spectroscopic Methods for Elucidating the Structures of Carotenoids*, citat din *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe Progress in the Chemistry Natural Products* de L. Zechmeister, vol. **XXVII**, Edit. Wien, Springer-Verlag-New York, 1969, p. 81.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 1, 45–51 (1973)

HIPERAMILAZEMIE PRODUSĂ ÎN URMA IRADIERII

RADU OLINESCU, STELA NIȚĂ, MIRCEA MUNȚIU și LETIȚIA COSTEA

Rezumat. — Folosind metoda Street-Close modificată, s-a confirmat producerea unei hiperamilazemii, atît după iradierea terapeutică a regiunii latero-cervicală, cît și după iradierea experimentală a întregului corp. Efectul studiat a fost observat la om, șobolan și porc.

Această hiperamilazemie se datorește eliberării enzimei din glandele salivare și are un maxim de 24–48 de ore de la iradiere, în funcție de specia animalului de experiență. Doza minimă care provoacă o creștere statistic semnificativă a amilazemiei variază și ea cu specia; la om o astfel de creștere se manifestă chiar după o singură doză terapeutică de 150 razi.

Hiperamilazemia produsă în urma iradierii este mai evidentă în cazul razelor gamma decît în acela al razelor Roentgen, folosite de alți autori.

În sînge, α-amilaza (E.C.3.2.1.1 — 1,4-glucan-4-glucanohidrolază) se găsește într-o cantitate destul de redusă, fiind în cea mai mare parte de origine pancreatică. În consecință, determinarea activității amilazei se folosește în mod curent pentru diagnosticul diferențial al funcțiilor pancreasului, analizele efectuîndu-se atît în ser, cît și în urină sau bilă. Astfel, o hiperamilazemie se observă în cazuri de pancreatită acută și obstrucții ale canalelor biliare. Scăderile nivelului amilazemiei în unele forme ale insuficienței pancreatice sau hepatice sînt destul de incerte, din cauza valorilor mici obținute în cazuri normale.

Într-un articol relativ recent, van den Brenk și colab. [1] au atras atenția asupra hiperamilazemiei produse în urma iradierii terapeutice a unor neoplazii situate în regiunea gîtului și în cea maxilar-inferioară. Această hiperamilazemie, evident, nu este de origine pancreatică și se suprapune unui nivel normal al enzimei secretate de pancreas.

Lucrarea noastră își propune atît verificarea hiperamilazemiei produse în urma iradierii terapeutice, cît și, mai ales, studierea acestui efect în condițiile iradierii experimentale.

MATERIAL ȘI METODĂ

Determinările activității amilazei plasmatice (folosind heparina ca anticoagulant) s-au efectuat la șobolani, rasa Wistar, masculi în greutate de 140 ±15 g și la porci, rasă selecționată, femele, în greutate de 60 kg.

De asemenea, s-a determinat amilazemia la un număr de 5 pacienţi ce aveau tumori în regiunea latero-cervicală.

Cînd s-a lucrat pe oameni şi pe porci, s-a determinat, pentru fiecare caz în parte, activitatea amilazei înainte şi după iradiere. În cazul şobolanilor, a fost considerat martor, un lot de animale neiradiate.

Iradierile s-au făcut în toate cazurile cu raze gamma provenite de la un Cobaltron Chisobalt 75 (Praga), 3000 Ci, debit 33 R/min, distanţă 165 cm. Pacienţii supuşi iradierii terapeutice au fost iradiaţi cu acelaşi dispozitiv, folosindu-se însă parametri variabili de la caz la caz.

Pentru determinarea amilazei nu s-a găsit încă o metodă perfectă. În ţara noastră se folosesc curent metoda Wohlgemuth (semicantitativă) şi metoda Smith şi Roe [2]. Cea mai corectă determinare a amilazei este bazată pe măsurarea maltozei rezultată din hidroliza amidonului (metode tip Somogyi). Tehnicile bazate pe acest principiu sînt însă laborioase, iar datorită cantităţii reduse de enzimă din sînge, precizia este relativă. Dintre metodele amiloclastice am ales metoda Street-Close [3] la care au fost necesare unele modificări pentru înlocuirea unor reactivi mai greu de procurat. În modificările aduse metodei Street-Close, am folosit unele indicaţii sugerate de referatele unor autori francezi [4], [5]. A fost utilizată următoarea modificare adusă metodei Street-Close :

După Ramet şi Sirotteau [4], lipsa unei tamponări nu ar influenţa reacţia catalizată de amilază. Deşi nu se obţin prea mari diferenţe între folosirea sau lipsa tamponării, pentru a păstra o mai bună reproductibilitate noi am menţinut tamponul aşa cum s-a indicat.

Reactivi : 1. Substrat : 0,1 g amidon solubil (reactivul) şi 2 g NaCl p.a. se adaugă la 60—70 ml apă distilată fierbinte, apoi se fierb 15 minute. După răcire se adaugă 10 ml tampon fosfat 0,2 M pH = 7,2 şi se completează la 100 ml cu apă distilată. Soluţia se păstrează la 4°C, cel mult o săptămînă.

2. Acid clorhidric normal;

3. Reactiv de culoare : se pun într-un balon cotat de 100 ml 0,1 g iodură de potasiu, 0,5 ml iodat de potasiu 0,050 g% şi 0,5 ml acid clorhidric normal. Se aduce la semn cu apă distilată. Se păstrează la 4°C, maximum o săptămînă.

Tehnica : În două eprubete (probă şi martor) se pun cîte 5 ml substrat, se ţin 10 minute la 37°C, după care numai în probă se adaugă 0,1 ml ser sau plasmă. Se agită şi se lasă în continuare la 37°C 15 minute. Reacţia este stopată cu 0,1 ml acid clorhidric normal (în ambele eprubete). Se ia din fiecare eprubetă cîte 1 ml, se adaugă 4 ml apă distilată şi 5 ml reactiv de culoare. Se citeşte absorbţia în primele 5 minute, la 620 nm, în cuva de 1 cm, faţă de apă distilată.

$$\textit{Calcul}: \frac{\text{absorbţia martor} - \text{absorbţia probei}}{\text{absorbţia martor}} \times 100 = \text{unit. Street-Close.}$$

Valorile normale la om sînt între 6—33 unit.

Tehnica modificată de noi dă rezultate superpozabile cu valorile obţinute prin metoda originală Street-Close, aşa cum este răspîndită de firma Merck (Merckotest, α-amylase, art. 3 301).

Aceste unităţi se pot converti în alte unităţi mai des folosite: 1 unit. Street-Close = 3,1 unit. Somogyi = 0,57 unit. internaţionale, 1 unit. Somogyi = 0,32 unit. Street-Close = 0,185 unit. inernaţionale.

În tehnica modificată propusă mai sus, s-a indicat folosirea tamponului fosfat pentru prepararea soluţiei de substrat.

Din cauza neomogenităţii, a structurii complexe a amidonului şi a complicatei reacţii de culoare nu s-a ajuns la un acord pentru exprimarea activităţii amilazei. Pentru eventuala comparare, s-au menţionat posibilităţile de convertire a diferitelor unităţi existente.

REZULTATE

Studiul efectului radiaţiilor ionizante asupra nivelului amilazemiei a fost început prin cercetarea dozei de iradiere la care eventuala modificare devine semnificativă.

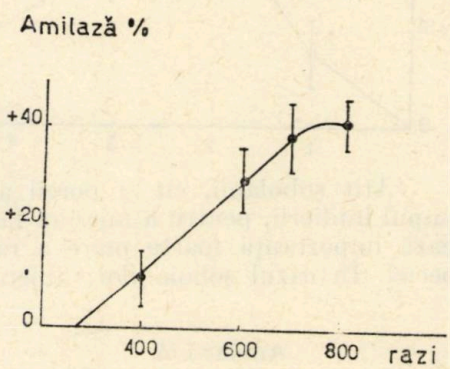


Fig. 1. — Efectul iradierii, cu diferite doze, asupra amilazei serice, la şobolan, după 24 de ore de la expunere. Valoarea 0 corespunde amilazemiei anterioare iradierii. Pe ordonată sînt trecute creşterile procentuale ale amilazemiei după iradiere.

După cum se observă în figura 1, la şobolan, după 48 de ore de la iradierea totală, creşterea amilazemiei este dependentă de doză în domeniul 400—700 razi, cu alte cuvinte pentru iradieri ce depăşesc DL 50. Folosirea unor doze mai mari de 700 razi, doză letală la şobolan, nu produce modificări suplimentare, sugerînd un platou.

Figura 2 indică o creştere a amilazemiei la şobolan, după iradiere, creştere semnificativă pentru intervalul 1—4 zile, cu un maxim după 48 de ore de la iradiere. Hiperamilazemia observată în primele patru zile de la iradiere coincide cu faza iniţială a bolii de iradiere; în perioada următoare, de stare, cînd organismul intră într-un echilibru aparent, dinamic, amilazemia revine în limite normale.

Pentru a cerceta efectul iradierii asupra altei specii, mai apropiate de om, cît şi pentru a-l studia pe un animal folosit ca propriul său martor, s-a urmărit evoluţia amilazemiei la porci iradiaţi. Pentru o doză de 360 razi, care la porci produce mortalitate după 12—15 zile, urmărirea evoluţiei amilazemiei este mai dificilă datorită marilor variaţii individuale. În general, s-au obţinut două feluri de curbe-răspuns pentru intervalul de 10 zile (fig. 3).

La porcii care au sucombat după aproximativ 15 zile, nu se observă modificări semnificative (o scădere) decît după 10 zile de la iradiere. De asemenea, este caracteristică lipsa hiperamilazemiei iniţiale.

În schimb, pentru porcii cu o evoluţie fatală la aproximativ 10—12 zile, curba amilazemiei este foarte semnificativă. Se observă o hiperamilazemie iniţială, cu maxim la 24 de ore de la iradiere, după care se revine la valori normale, apărînd o prăbuşire, cu variaţii mari individuale, către ziua a zecea.

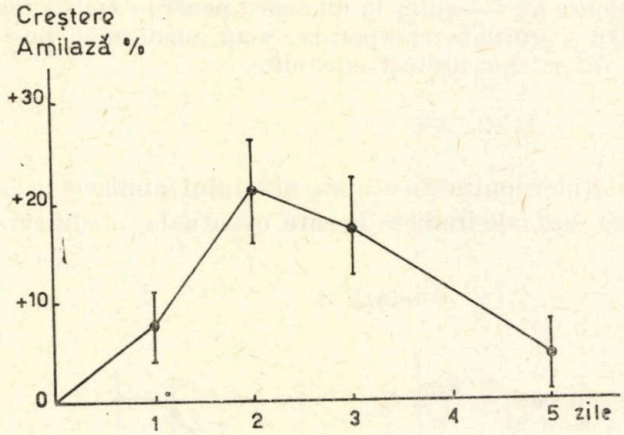


Fig. 2. — Modificările amilazemiei în urma iradierii şobolanilor cu o doză de 700 razi. Creşterile procentuale ale amilazemiei se referă la valoarea anterioară iradierii. Fiecare punct corespunde determinărilor efectuate pe 10 animale.

Atît şobolanii, cît şi porcii au fost contenţionaţi în mod egal în timpul iradierii, pentru a micşora factorul geometric. Datele noastre sugerează importanţa foarte mare a radiosensibilităţii individuale, dar şi a speciei. În cazul şobolanilor, hiperamilazemia apărută în primele patru

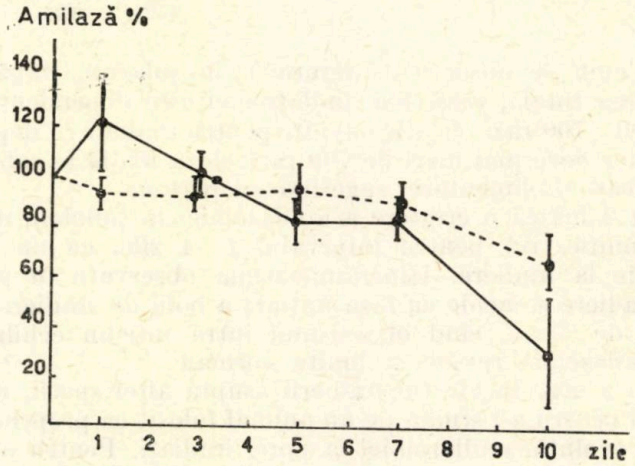


Fig. 3. — Efectul iradierii asupra amilazemiei la porci. Fiecare animal a fost propriul său martor, valoarea anterioară iradierii a fost luată drept 100. Mediile şi abaterile respective s-au calculat ţinînd seama de modificările survenite la fiecare porc după iradiere.

Linia plină = porci ce au sucombat după 10—12 zile; linia întreruptă = porci care au avut o mortalitate după aproximativ 15 zile. Pentru fiecare curbă s-au folosit 10 animale.

zile după iradiere este foarte evidentă şi întrece factorul individual. În schimb, chiar la porcii la care s-a evidenţiat această hiperamilazemie, ea este de o amplitudine mai mică. Acest rezultat este cu atît mai evident, cu cît regiunea glandelor parotide a fost mult mai expusă iradierii, la porci decît la şobolani.

Experienţa noastră în domeniul iradierii terapeutice la om este mai restrînsă. Pe un număr de cinci pacienţi, prezentînd neoplazii în regiunea inferioară a capului şi gîtului, o primă iradiere (fig. 4) de 200 razi produce o netă creştere a amilazemiei. Această creştere a amilazemiei este maximă pentru prima iradiere, scăzînd progresiv în urma iradierilor ulterioare.

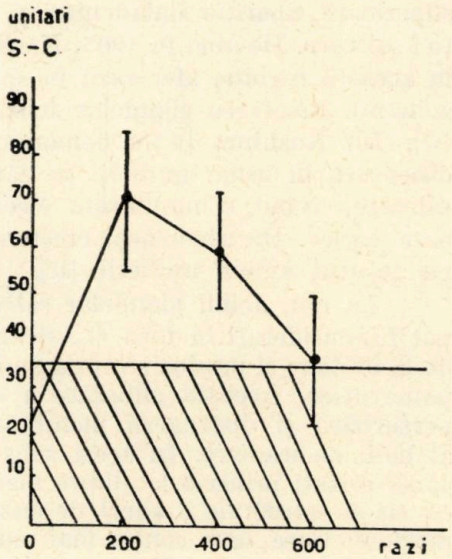


Fig. 4. — Modificările amilazemiei în urma iradierii repetate terapeutice a unor pacienţi cu 200 razi, pacienţi ce prezentau tumori în regiunea latero-cervicală.

Datele obţinute la om sînt în concordanţă cu cele obţinute de alţi autori [1], [6] care au folosit raze Roentgen.

DISCUŢII

Rezultatele noastre confirmă apariţia unei hiperamilazemii în urma iradierii terapeutice [1], [6], [7]. La om, hiperamilazemia este evidentă mai ales pentru prima iradiere, după care factorul individual predomină. Această hiperamilazemie după prima zi, observată de noi la toţi pacienţii, s-ar putea datori utilizării razelor gamma, mai penetrante decît razele Roentgen folosite de ceilalţi autori.

Datele obţinute de noi indică importanţa speciei, efectul studiat fiind mai evident la şobolan >om> porc. Al treilea factor care intervine este expunerea regiunii glandelor parotide iradierii; important mai ales pentru animalele mari.

În cazul iradierii experimentale, cu doză mică, evoluţia ulterioară a amilazemiei depinde de doza de iradiere, dar şi de radiosensibilitatea individuală. Aceasta corespunde iradierii terapeutice, adică la o însumare de iradieri fracţionate pentru care glandele salivare sînt epuizate [1]. Rezultatele pozitive obţinute de noi la om s-au observat fără stimularea în prealabil a glandelor salivare [1] sau folosirea unei atmosfere hiperbarice în momentul iradierii, procedeu utilizat de van den Brenk [1].

Glandele salivare prezintă o mare radiosensibilitate, de un ordin apropiat cu al limfocitelor, celule cu cea mai mare radiosensibilitate. Încă de mult timp s-a observat adesea, după iradierea terapeutică a unor pacienţi cu tumori ale tractului digestiv superior sau a căilor respiratorii superioare, apariţia sialadenitei şi xerostomiei sau chiar pierderea funcţiei salivare. De-abia în 1965, Kashima şi colab. [6] au arătat că iradierea în această regiune afectează în special componentele secretorii (glandele acinare). Afectarea glandelor acinare este semnificativă chiar la 100 razi [6]. Tot Kashima [6] a demonstrat, electroforetic, că hiperamilazemia observată în urma iradierii se datoreşte enzimei eliberate din glandele salivare, avînd o mobilitate electroforetică diferită de cea a enzimei pancreatice. De asemenea, creşterea amilazemiei este corelată cantitativ cu ţesutul expus iradierii [6].

La om, acinii glandelor salivare prezintă un indice mitotic mic şi pot fi consideraţi în faza G_0. Schimbările citolitice apar după cîteva ore de la iradiere şi produc secreţia amilazei ce se suprapune, în sînge, enzimei pancreatice. Această eliberare a amilazei pare să confirme importanţa perturbării şi distrugerii membranelor celulare şi subcelulare, ca efect al bolii de iradiere. În acest sens ar putea fi incriminaţi lizozomii [7], caracterizaţi printr-o labilitate mai mare a membranei, cu atît mai mult, cu cît ei constituie o sursă de enzime hidrolitice. Totuşi leucocitele polimorfonucleare, care conţin mai mulţi lizozomi decît limfocitele, sînt mult mai radiorezistente. De asemenea, agenţii care stabilizează membrana lizozomială (corticoizi, clorochin) nu au proprietăţi radioprotectoare [8], iar agenţii ce labilizează această membrană (vitamina A, hemolizina) nu au proprietăţi de radiosensibilizatori.

Totuşi, descărcarea amilazei în urma iradierii pare să fie datorită perturbării membranei celulare, deoarece transportul activ al ionilor de potasiu şi, în special, de sodiu s-a dovedit a fi foarte radiosensibil [9], [10], fapt observat la hematii şi muşchi.

Hiperamilazemia produsă în urma iradierii experimentale şi terapeutice ar putea fi folosită în diagnosticul sau prognoza perturbărilor induse de radiaţiile ionizante în organismele vii.

CONCLUZII

1. S-a confirmat apariţia unei hiperamilazemii după 1—4 zile în urma iradierii experimentale sau terapeutice, a zonei gîtului şi maxilar-inferioare.

2. Această hiperamilazemie este proporţională cu doza de iradiere, la şobolan, pînă la o doză corespunzătoare dozei letale 100%, şi este în general mai mare după prima iradiere.

3. Efectul studiat este dependent de specie, de radiosensibilitatea individuală şi de zona expusă iradierii.

Spitalul clinic Fundeni,
Secţia de radiobiologie
Bucureşti

Prezentat la redacţie
la 22 iunie 1972

RADIATION—INDUCED HYPERAMYLASEMIA

SUMMARY

A hyperamylasemia produced after the therapeutical irradiation of the lateral-cervical region as well after experimental irradiation of the whole body by using a modification of the Street and Close method. The effect was observed in men, rats and pigs.

This hyperamylasemia is due to the release of enzyme from salivary glands and has a maximum 24—48 hours after irradiation depending on the animal species used. The lowest dose which produces a significant increase of amylasemia, varies also with the animal species : for man such an increase is evident even after a single therapeutical dose of 150 rads.

The radiation-induced hyperamylasemia is more evident in the case of gamma rays than of Roentgen rays used by other authors.

BIBLIOGRAFIE

1. H.A. VAN DEN BRENK, R.A. HURLEY, C. GOMEZ, W. RICHTER, Brit. J. Radiol., **42**, 688 (1969).
2. B. SMITH, J.H. ROE, J. Biol. Chem., **179**, 53 (1949).
3. H.V. STREET, J.R. CLOSE, Clin. Chim. Acta, **3**, 476 (1958).
4. M. RAMET, J.C. SIROTTEAU, Annal. Biol. Clin., **24**, 907 (1966).
5. P. FONTY, C. LEDUC, Annal. Biol. Clin., **24**, 923 (1966).
6. H.K. KASHIMA, W.R. KIRKHAM, R.J. ANDREWS, Am. J. Roent., **94**, 271 (1965).
7. E.B. SILVERSTEIN, I.W. CHEN, E. L. SANGER, în „Biochemical Indicators in man", Proc. Sci. Meet. p. 181, A.E.I.A. Viena, 1971.
8. G. WEISSMAN, Blood, **24**, 594 (1965).
9. R.M. DOWBEN, L. ZUCKERMAN, Nature, **197**, 400 (1963).
10. T. KANAKURA, W. NAKAMURA, H. ETO, Int. J. Rad. Biol., **15**, 125 (1969).

ST. CERC. BICCHIM., 16, 1, 53–59, (1973)

INFLUENȚA IONULUI DE RUBIDIU ASUPRA CONȚINUTULUI ȘI EXOSMOZEI ACIDULUI LACTIC, PRECUM ȘI A CONȚINUTULUI ÎN APĂ TOTALĂ LA MUȘCHII SARTORIUS ȘI GASTROCNEMIENI DE BROASCĂ

LORA SCOLNIC

Rezumat. — Ionul de rubidiu introdus în mediul de imersare al mușchiului gastrocnemian de broască produce o scădere evidentă a conținutului în apă totală, proporțională cu creșterea concentrației de RbCl din mediu. Rb^+ determină la mușchii sartorius și gastrocnemieni de broască o scădere semnificativă a conținutului lor în acid lactic; această scădere este accentuată a creșterea concentrației de RbCl din mediul de imersare. Rb^+ induce la mușchiul sartorius o creștere semnificativă a permeabilității membranei musculare pentru difuzia acidului lactic, proporțională cu creșterea concentrației de RbCl. La mușchiul gastrocnemian, creșterea permeabilității membranei este determinată doar de cea mai mare concentrație de RbCl studiată. Efectul Rb^+ asupra glicolizei este asemănător celui produs de K^+, ceea ce arată că efectul K^+ nu este specific.

Materia vie nu conține decît urme de Rb^+, dar interesul pe care-l prezintă acest element rezidă în faptul că deplasările sale în organism par asemănătoare cu ale K^+ [1].

Numeroase cercetări au arătat că Rb^+ poate fi acumulat în mari cantități de celulele musculare [2–5]. Astfel, Relman și colab. [6], hrănind șobolani tineri cu cantități echivalente de K^+ și Rb^+, găsesc o mai mare afinitate a țesutului muscular pentru Rb^+ decît pentru K^+, iar Lubin și Sneider [7] demonstrează, pe mușchiul sartorius de broască *in vitro*, posibilitatea înlocuirii totale a K^+ intracelular cu Rb^+. De asemenea s-a constatat că Rb^+ are efecte similare cu ale K^+ asupra țesuturilor excitabile [7], Rb în mediu extern depolarizînd membrana, mai mult sau mai puțin eficient decît K^+, în funcție de țesut [8–11].

Rezultatele obținute de diferiți cercetători [12–14] par să arate existența, pentru cei doi ioni, a unui singur mecanism de transport, sugerat nu numai de strînsa lor similitudine chimică, dar și de faptul că fiecare ion pare să inhibe competitiv pătrunderea celuilalt în mușchiul de broască [15–17]. Cu toate acestea, Muller și colab. [18] semnalează o comportare diferită a celor doi ioni în ceea ce privește glicoliza musculară.

Deoarece în lucrări anterioare [19], [20] noi am evidențiat o influență similară a ionilor de Rb^+ și K^+ asupra producerii de acid piruvic la mușchiul sartorius de broască, în lucrarea de față ne-am propus să

urmărim dacă și în cazul acidului lactic, ultimul termen al glicolizei, Rb^+ se comportă asemănător K^+ [21].

Lucrarea mai are scopul să urmărească dacă scăderea conținutului în apă totală și creșterea permeabilității membranei musculare pentru difuzia acidului lactic, constatată în prezența K^+ extern [21], apare și în cazul Rb^+.

MATERIAL ȘI METODE

Experiențele au fost efectuate pe mușchii sartorius și gastrocnemieni de broască (*Rana ridibunda*). Izolarea mușchilor sartorius a fost efectuată la două ore după distrugerea măduvei spinării, iar a gastrocnemienilor după amputarea simultană a picioarelor posterioare.

După izolarea atentă, în vederea evitării traumatismului, mușchii au fost tamponați ușor pe hîrtie de filtru, cîntăriți, apoi imersați în soluțiile corespunzătoare.

La martor, mușchii sartorius și gastrocnemieni au fost imersați în 10, respectiv 12 ml soluție Ringer-Jendrassik [22], conținînd la litru 6,5 g clorură de sodiu, 0,2 g clorură de potasiu, 0,2 g clorură de calciu și 0,1 g bicarbonat de sodiu. În vederea studierii efectului concentrațiilor diferite de ioni de Rb^+, mușchii erau introduși în soluție Ringer care, în locul KCl conținea RbCl în concentrație de 10, 20, respectiv 50 mM/l, ceilalți constituenți fiind în concentrația menționată mai sus.

Mușchii au fost imersați timp de 3 ore și jumătate, sub barbotare continuă și constantă cu un curent de oxigen. La intervale de aproximativ 20 de minute conținutul vasului de imersie se agita ușor. După îndepărtarea din soluția Ringer corespunzătoare, mușchii au fost imediat tamponați ușor pe hîrtie de filtru, mărunțiți, cîntăriți, apoi omogenizați la rece, într-un omogenizator Potter, cu 3 ml la mușchiul sartorius și, respectiv, 7 ml acid tricloracetic 10% la mușchiul gastrocnemian. Extractul tricloracetic a fost apoi centrifugat la 4 500 rot/min, timp de 15 minute. Pentru dozarea acidului lactic, efectuată după metoda Barker și Summerson [23], s-au folosit 1,5, respectiv 1,0 ml supernatant.

S-a determinat atît conținutul în acid lactic al mușchiului, cît și cantitatea difuzată în soluția de imersie, pentru ca însumarea celor două valori să reflecte totalitatea acidului lactic existent la sfîrșitul experienței.

Pentru dozarea acidului lactic în soluția de imersie s-au folosit 8, respectiv 3 ml.

Rezultatele au fost exprimate în μg/g mușchi umed, cînd ne-am referit la conținutul mușchilor în acid lactic, iar valorile pentru acidul lactic exosmozat sînt exprimate în μg/mușchi.

Determinarea de apă totală s-a efectuat doar pe mușchii gastrocnemieni, deoarece influența Rb^+ asupra conținutului în apă totală al mușchiului sartorius a fost semnalată anterior [19]. Mușchii gastrocnemieni au fost imersați în aceleași condiții ca la determinarea acidului lactic, iar apa s-a determinat prin cîntărirea mușchiului înainte și după uscare pînă la greutate constantă și s-a exprimat în g/g de substanță uscată.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Într-o lucrare anterioară [21] am pus în evidență faptul că mușchii simetrici ai aceleiași broaște conțin cantități aproape egale de acid lactic și pierd prin exosmoză cantități practic egale din acest acid. Acest fapt a permis să se urmărească, pe același animal, influența exercitată de ionul Rb^+ asupra glicolizei, ca și asupra permeabilității membranei musculare pentru acidul lactic.

Din datele trecute în tabela 1 se constată că mușchii gastrocnemieni imersați în soluție Ringer-Jendrassik cu un adaos de RbCl în locul KCl variind între 10—50 mM/l, conțin o cantitate de apă totală mai mică decît mușchii martor imersați în soluție Ringer-Jendrassik. Deshidratarea mușchilor este practic proporțională cu creșterea concentrației de RbCl în mediul de imersie.

Tabela 1

Conținutul în apă totală al mușchilor gastrocnemieni de broască imersați în soluție Ringer-Jendrassik cu adaos de RbCl

Mușchi tratat cu RbCl = R
Mușchi martor = M

Greutatea mușchilor g		Concentrația RbCl mM/l	Apa totală g/g substanță uscată		Diferența g/g substanță uscată
M	R		M	R	R — M
0,67	0,66	10	4,49	4,33	—0,16
0,63	0,61	10	4,88	4,75	—0,13
0,50	0,49	10	4,19	4,09	—0,10
0,51	0,50	10	4,60	4,47	—0,13
Media 0,58	0,57		4,54	4,41	—0,13
0,48	0,49	20	4,01	3,84	—0,17
0,46	0,47	20	4,29	4,09	—0,20
0,62	0,61	20	4,31	4,12	—0,19
0,53	0,54	20	3,88	3,64	—0,24
Media 0,52	0,53		4,12	3,92	—0,20
0,53	0,52	50	4,73	4,45	—0,28
0,54	0,53	50	5,05	4,65	—0,40
0,44	0,45	50	4,28	3,98	—0,30
0,53	0,52	50	4,80	4,47	—0,33
Media 0,51	0,50		4,71	4,38	—0,33

Rezultatele noastre sînt comparabile cu datele publicate de unii cercetători, după care cantitatea apei totale a mușchiului [24], [25],

sau a altor organe [26—28], este dependentă de osmolaritatea mediului înconjurător.

Din tabelele 2 și 3 se constată că prezența în lichidul de imersie a RbCl în concentrație de 10, 20, respectiv 50 mM/l determină o scădere evidentă a conținutului în acid lactic al mușchilor sartorius și gastrocnemieni.

Tabela 2

Conținutul și exosmoza acidului lactic la mușchii sartorius de broască imersați în soluție Ringer-Jendrassik cu adaos de cantități diferite de RbCl

Mușchi tratat cu RbCl = R
Mușchi martor = M

Greutatea mușchilor g		Concentrația RbCl mM/l	Acid lactic în mușchi µg/g țesut umed		Acid lactic exosmozat µg/mușchi		Acid lactic din mușchi + acid lactic exosmozat µg/mușchi	
M	R		M	R	M	R	M	R
0,15	0,15	10	1000	728	80	85	230	193
0,14	0,15	10	953	680	73	68	206	170
0,13	0,12	10	780	630	55	60	156	134
0,14	0,13	10	930	780	75	70	205	171
Media 0,14	0,14		915	704	71	71	199	167
0,13	0,14	20	980	600	86	90	213	174
0,16	0,16	20	1100	660	95	102	271	208
0,11	0,10	20	1120	580	75	81	198	139
0,14	0,14	20	810	400	62	69	175	125
Media 0,13	0,13		1000	560	79	85	214	160
0,12	0,13	50	950	250	84	88	198	120
0,14	0,14	50	1080	300	79	75	230	117
0,13	0,13	50	890	230	68	72	184	100
0,15	0,14	50	740	150	53	56	164	77
Media 0,13	0,13		915	232	71	73	194	104

În evaluarea rezultatelor, am avut în vedere modificările de greutate a mușchilor corespunzătoare fiecărei concentrații de RbCl. Datele noastre diferă de cele ale lui Muller și colab. [18] care nu înregistrează modificarea glicolizei la adaosul ionilor de Rb^+ în mediul extern. Ele concordă însă cu cele semnalate anterior de noi sub influența K^+ [21], modificările fiind în același sens cu cele produse asupra acidului piruvic [19].

Este de menționat faptul că, în ciuda conținutului scăzut în acid lactic al mușchiului sartorius, sub influența Rb^+, exosmoza acestuia este identică cu a mușchiului martor, ceea ce pledează pentru creșterea semnificativă a permeabilității membranei musculare pentru difuzia acidului

Tabela 3

Conţinutul şi exosmoza acidului lactic la muşchii gastrocnemieni de broască imersaţi în soluţie Ringer-Jendrassik cu adaos de cantităţi diferite de RbCl

Muşchi tratat cu RbCl = R
Muşchi martor = M

	Greutatea muşchilor g		Concentraţia RbCl mM/l	Acid lactic în muşchi µg/g ţesut umed		Acid lactic exosmozat µg/muşchi		Acid lactic din muşchi + acid lactic exosmozat µg/muşchi	
	M	R		M	R	M	R	M	R
	0,47	0,48	10	590	360	110	90	387	263
	0,50	0,50	10	400	310	131	112	331	267
	0,67	0,66	10	410	260	168	98	442	270
	0,61	0,60	10	450	280	200	140	474	300
Media	0,56	0,56		460	300	152	110	409	275
	0,54	0,54	20	740	490	161	93	561	358
	0,59	0,60	20	660	380	78	52	467	280
	0,50	0,49	20	680	300	80	52	420	199
	0,73	0,74	20	630	340	120	83	580	335
Media	0,59	0,59		680	380	110	70	507	293
	0,57	0,56	50	530	280	132	150	434	307
	0,45	0,45	50	600	160	173	200	443	272
	0,64	0,63	50	570	190	168	161	533	280
	0,50	0,49	50	530	90	127	156	392	201
Media	0,53	0,52		560	180	150	167	450	265

lactic. La muşchiul gastrocnemian, Rb^+ determină creşterea semnificativă a permeabilităţii doar la concentraţia de 50 mM/l. În cazul muşchilor gastrocnemieni imersaţi în soluţie Ringer-Jendrassik ce conţine, în locul KCl, RbCl în concentraţie de 10 şi 20 mM/l, se observă o oarecare proporţionalitate între conţinutul şi exosmoza acidului lactic, ceea ce arată că la concentraţiile menţionate ionul de Rb^+ nu afectează permeabilitatea membranei pentru difuzia acidului lactic.

Diferenţa de comportare, sub influenţa Rb^+, a celor doi muşchi s-ar putea datori schimbărilor ionice mai intense care au loc în muşchiul sartorius faţă de cel gastrocnemian [29].

Rezultă că deşi datele din literatură menţionează o comportare diferită a ionilor de K^+ şi Rb^+ în ce priveşte glicoliza, noi obţinem, în condiţiile noastre de lucru, o comportare similară a celor doi ioni, şi anume inhibarea glicolizei.

Rezultatele cuprinse în lucrarea de faţă relevă faptul că efectul K^+ asupra glicolizei [21] nu este specific, Rb^+ comportîndu-se asemănător cu K^+.

CONCLUZII

1. Ionul de Rb^+ adăugat mediului de imersie al mușchiului gastrocnemian de broască produce o scădere evidentă a cantității de apă totală a mușchiului, proporțională cu creșterea concentrației de RbCl din mediu.

2. Ionul de Rb^+ adăugat mediului de imersie al mușchilor sartorius și gastrocnemieni de broască determină o scădere evidentă a conținutului lor în acid lactic, scădere accentuată la creșterea concentrației de RbCl din mediu.

3. Rb^+ determină : a) la mușchiul sartorius o creștere semnificativă a permeabilității membranei musculare pentru difuzia acidului lactic, proporțională cu creșterea concentrației de RbCl din mediu ; b) la mușchiul gastrocnemian o creștere semnificativă a permeabilității membranei, doar la cea mai mare concentrație de RbCl studiată.

4. Efectul Rb^+ asupra glicolizei este asemănător celui produs de K^+, ceea ce arată că efectul K^+ nu este specific.

Prezentat la redacție
la 7 iulie 1972

Institutul de biochimie
București

BIBLIOGRAFIE

1. J. Colin, I. Stolcoweky, Ann. Endocrinology, **24**, 538 (1963).
2. L. B. Mendel, O. E. Closson, Amer. J. Physiol., **16**, 152 (1906).
3. P. H. Mitchel, J. W. Wilson, R. E. Stanton, J. Gen. Physiol., **4**, 141 (1921).
4. L. A. Happel, C. A. A. Schmidt, Univ. California, Publ. Physiol., **8**, 189 (1938).
5. A. S. Relman, A. M. Roy, W. B. Schwartz, J. Clin. Invest., **34**, 538 (1955).
6. A. S. Relman, A. T. Lambie, B. A. Burrows, A. M. Roy, J. Clin. Invest., **36**, 1249 (1957).
7. M. Lubin, P. Sneider, J. Physiol., **138**, 140 (1957).
8. T. P. Feng, Y. M. Liu, J. Cell. Comp. Physiol., **34**, 33 (1949).
9. A. Sandow, H. Mandel, J. Cell. Comp. Physiol., **38**, 271 (1951).
10. A. V. Hill, J. V. Howarth, Proc. Roy. Soc. London B, **147**, 21 (1957).
11. R. H. Adriani, Amer. Med. Exp. Biol. Fernaie, **34**, 26 (1956).
12. W. D. Love, R. B. Ramney, G. E. Burch, Circ. Research, **2**, 112 (1954).
13. M. P. Tyor, I. S. Eldridge, Am. J. M. Sc., **232**, 186 (1956).
14. R. Kilpatrick, H. E. Reuschler, D. S. Munro, J. M. Wilson, J. Physiol., **133**, 194 (1956).
15. G. N. Ling, Proc. Internal. Physiol. Congress., 1953, p. 566.
16. R. A. Sjodin, J. Gen. Physiol., **42**, 983 (1959).
17. G. N. Ling, J. Physiol. Med., **34**, 89 (1955).
18. M. Muller, S. E. Simon, Biochem. Biophys. Acta, **37**, 107 (1960).
19. L. Scolnic, St. cerc. biochim., **3**, 319 (1971).
20. L. Scolnic, St. cerc. biochim., **1**, 93 (1972).
21. L. Scolnic, St. cerc. biochim., **3**, 289 (1972).
22. L. Jendrassick, I. Faiszt, Rolando Eotvos Nominatae Sect. Biol., **1**, 133 (1957).
23. S. B. Barker, V. A. Summerson, J. Biol. Chem., **138**, 535 (1941).
24. V. I. Stabroskaya, N. M. Nastretayeva, A. D. Brown, Cytologia, **9**, 1137 (1970).
25. Y. Y. Nastchin, Zh. Obsch. Biol., **27**, 473 (1966).
26. E. Cotlier, B. Kwan, C. Beaty, Biochem. Biophys.Acta, **150**, 705 (1968).
27. I.A. Karcley, E. J. Hambert, R. White, Biochem. J., **80**, 9P (1961).
28. A. K. Kleizeller, I. Nadvitkova, A. Kotkova, Biochem. Biophys. Acta, **135**, 286 (1967).
29. R. D. Keynes, Proc. Roy. Soc., London B, **142**, 359 (1954).

THE EFFECT OF RUBIDIUM IONS UPON LACTIC ACID AND TOTAL WATER CONTENT AS WELL AS UPON LACTIC ACID EXOSMOSIS IN SARTORIUS AND GASTROCNEMIUS FROG MUSCLES

SUMMARY

Rubidium ions introduced in the immersion medium of frog gastrocnemius muscles induce a significant decrease in the total water content of muscles, proportional to the increase in rubidium chloride concentration. Rb^+ produces an evident decrease in the lactic acid content of sartorius and gastrocnemius muscles ; this decrease becomes more proeminent as rubidium chloride concentration increases. Rb^+ also produces an evident increase in the permeability of the sartorius muscle membrane, proportional to the increase in rubidium chloride concentration. In gastrocnemius muscles, the increase of the membrane permeability is observed only at the greatest rubidium chloride concentration studied. The effect of Rb^+ upon glycolysis is similar to that produced by K^+ ; this fact proves that the effect of K^+ is not specific.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 1, 61–69 (1973)

INTERACȚIUNEA PROTEINELOR CEREBRALE CU UNELE SĂRURI CUATERNARE DE AMONIU FLUORESCENTE DERIVATE DE LA STILBEN

HORST D. SCHELL și TRAIAN BENȚIA

Rezumat. — Studiul interacțiunii proteinelor cerebrale acvosolubile din creierul de broască și de șobolan cu unele săruri cuaternare de amoniu fluorescente derivate de la stilben, precum și cu unele săruri cuaternare de amoniu folosite ca relaxanți musculari în clinică (d-tubocurarină, succinilcolină, decametoniu) a arătat că o parte din sărurile cercetate, și anume cele de tipul pahicurarelor, formează complecși cu anumite fracțiuni ale proteinelor cerebrale.

Complecșii formați, fluorescenți în cazul derivaților de la stilben, se prezintă sub formă de flocoane amorfe și pot fi izolați, purificați și scindați în părțile lor componente : proteină și sare cuaternară.

Dacă concentrația sării cuaternare de amoniu adăugate extractului proteic din creier crește peste 3% se formează și complecși solubili, care în cîmp electric sau prin dializă se transformă ușor în complecșii insolubili amintiți mai sus prin pierderea excesului de sare cuaternară de amoniu, fixată doar cu legături slabe de suprafața lor.

Rezultatele experimentale obținute arată că proteinele cerebrale, indiferent de gradul de evoluție a animalului, se comportă față de sărurile cuaternare de amoniu studiate, asemănător cu proteinele serice și musculare.

Cercetînd unele aspecte legate de vehicularea în sînge și localizarea în organism a unor substanțe curarizante fluorescente, derivate de la stilben [1], am constatat că acestea formează complecși fluorescenți, în mod preferențial, numai cu anumite fracțiuni ale proteinelor serice [2] și musculare [3], constatare valabilă indiferent de gradul de evoluție al animalului de experiență [4].

Complecșii rezultați au putut fi izolați, purificați și scindați în părțile lor componente : proteină și sare cuaternară de amoniu. Fracțiunea proteică care, în cazul proteinelor musculare sarcoplasmatice, reacționează cu sărurile cuaternare de amoniu prin formare de complecși își păstrează activitatea biologică inițială și după eliberarea ei din complex, prin scindarea acestuia [5]. S-a constatat totodată că formarea acestor complecși are loc sau nu, în funcție de gradul de lipofilie al sărurilor cuaternare de amoniu și de mecanismul de acțiune prin care ele produc blocarea transmisiei neuromusculare [6]. Astfel, numai produșii de tipul pahicurarelor,

adică agenţii de blocare competitivă, reacţionează prin formare de complecşi, nu şi leptocurarele, care acţionează printr-o depolarizare persistentă a membranei postjuncţionale.

Demne de amintit, cu această ocazie, sînt lucrările efectuate de S. Ehrenpreis [7]—[9] şi A. Hassón [10]—[12], care au studiat în acelaşi timp, sau după noi, interacţiunea unor săruri cuaternare de amoniu cu proteinele din extractele proteice obţinute din organul electric de la *Electrophorus electricus* L., precum şi lucrarea lui K.E. Neet şi S.L. Friess [13], care au lucrat pe extracte proteice din nervul sciatic de broască şi cîine. Autorii citaţi constată de asemenea o formare de complecşi între anumite fracţiuni proteice şi sărurile cuaternare de tipul pahicurarelor — dar nu şi în cazul leptocurarelor — şi presupun că proteina care reacţionează cu sarea cuaternară, formînd un complex, ar fi receptorul specific al acetilcolinei. Această presupunere este însă încă discutată [12], [14], [15].

În continuarea lucrărilor noastre anterioare din acest domeniu, am studiat în lucrarea de faţă comportarea proteinelor cerebrale faţă de aceleaşi săruri cuaternare de amoniu folosite şi în cazul proteinelor serice şi musculare, cu scopul de a vedea în ce măsură constatările anterioare sînt valabile şi pentru proteinele cerebrale, adică dacă şi în acest caz există anumite fracţiuni proteice cu o afinitate deosebită pentru sărurile cuaternare de amoniu şi dacă şi în acest caz cele două categorii de săruri cuaternare se comportă diferit. Am lucrat pe extracte proteice cerebrale provenite de la animale situate pe trepte diferite ale evoluţiei filogenetice, şi anume pe extracte obţinute din creierul unor animale cu sînge rece (broască) şi din creierul unor animale cu sînge cald (şobolan).

MATERIAL ŞI METODE

1. *Extracţia proteinelor cerebrale.* Probe medii formate din 20—25 de creiere de broască sau din 3—5 creiere de şobolan, scoase imediat după decapitarea animalului, spălate cu soluţie fiziologică, pentru îndepărtarea urmelor de sînge, şi uscate pe hîrtie de filtru, se cîntăresc şi se mojarează cu puţin nisip de cuarţ, într-un mojar de porţelan răcit în prealabil. Materialul mojarat se suspendă apoi, pentru extracţia proteinelor, într-o soluţie răcită de tampon de fosfaţi, cu pH = 7,6 şi forţă ionică 0,1, folosind la extracţie raportul de 1 ml soluţie tampon pentru 1 g creier. După un repaus de 24 de ore, la 4°C, pentru extragerea proteinelor, omogenatul se centrifughează la o centrifugă cu răcire, timp de 30 min, la 14 000 g. Supernatantul perfect limpede poate fi utilizat apoi direct în cercetările ulterioare, după îndepărtarea prealabilă a unei pojghiţe lipoidice superficiale, care se formează întotdeauna în timpul centrifugării.

2. *Determinarea concentraţiei proteice* a extractelor cerebrale obţinute s-a efectuat după metoda clasică de microkjeldahlizare în acid sulfuric a unei părţi alicote din extractul proteic deproteinizat şi nedeproteinizat [16].

3. *Cercetarea interacţiunii proteinelor cerebrale cu sărurile cuaternare de amoniu.* S-au folosit aceleaşi condiţii experimentale ca şi în cazul proteinelor serice [2] şi musculare [3]. Peste un anumit volum de extract

proteic, de exemplu 1 ml, se adaugă picătură cu picătură, sub continuă agitare, un volum egal din soluția sării cuaternare de amoniu de cercetat, a cărei concentrație varia între 0,05—8% (0,05; 0,1; 0,5; 1; 3; 5 și 8%). După o oră de repaus, la temperatura camerei, în cazul extractului proteic de creier de broască, și la 37°C, în cazul extractului proteic de creier de șobolan, se centrifughează proba timp de 5 min la 3 500 g, pentru depunerea complexului separat. Supernatantul limpede obținut este apoi supus analizei electroforetice pe hîrtie, pe gel de poliacrilamidă și agaroză, iar complexul depus este spălat de trei ori cu apă distilată, pentru îndepărtarea completă a proteinelor și sării cuaternare din supernatant, în vederea studierii sale ulterioare.

4. *Electroforeza pe hîrtie.* S-au folosit benzi de hîrtie Whatman 1, de 3 × 26 cm, aplicînd pe linia de start cîte 25—30 µl din supernatantul probelor tratate cu sarea cuaternară de amoniu sau, drept martor, același volum din extractul proteic diluat 1 : 1 cu apă distilată. Pentru migrarea electroforetică, efectuată la temperatura camerei, s-a folosit o soluție tampon de veronal-medinal, pH = 8,6, forță ionică 0,05, la 0,3 mA/cm și 220 V. După 9 ore de migrare, benzile sînt uscate mai întîi la temperatura camerei, apoi fixate timp de 10 min la 110°C și colorate cu o soluție alcoolică 0,1% de albastru de bromfenol ce mai conține 5% clorură mercurică și 10% acid acetic [17], iar pentru relevarea glicoproteinelor cu o soluție de 0,1% de albastru de toluidină. Deoarece prin colorarea directă a benzilor cu albastru de toluidină sînt puse în evidență numai glicoproteinele acide, s-a folosit această colorare și după o oxidare prealabilă a glicoproteinelor de pe benzile de electroforeză, cu acid periodic și apă de brom, pentru punerea în evidență și a glicoproteinelor neutre, pe lîngă cele acide.

5. *Evaluarea cantitativă a proteinelor de pe electroforegrame* s-a făcut prin metoda eluției și colorimetrare. În acest scop, benzile de hîrtie Whatman erau tăiate în fîșii de cîte 2 mm lățime și eluate, fiecare în parte, timp de 30 min la temperatura camerei, în 2 ml soluție metanolică de carbonat de sodiu, obținută prin amestecarea de volume egale dintr-o soluție apoasă 10% de carbonat de sodiu cristalizat și metanol. Colorimetrarea probelor s-a efectuat la un fotometru Pulfrich (cuvă : d = 0,5; λ = 533 mµ).

6. *Electroforeza în gel de poliacrilamidă* s-a efectuat vertical, în strat subțire, după metoda lui L.P. Akroyd [19], modificată de D. Tănăsescu și N. Moldoveanu [20]. Gelul folosit a avut o concentrație de 7% și a fost obținut prin dizolvarea a 1,33 g acrilamidă și 0,07 g bisacrilamidă în 19 ml soluție tampon Tris-EDTA, pH 7,15 (10,8 g Tris, 27 g acid boric, 1 g EDTA adus cu apă la 1 000 ml) la care s-a mai adăugat 0,06 ml TEMED (N, N, N′, N′ — tetrametil-etilen-diamină) și 0,01 g persulfat de amoniu drept catalizator dizolvat în prealabil într-un ml din aceeași soluție tampon. După o migrare de 3 ore la 25 mA și 350 V se introduce gelul pentru 30 min într-o soluție 0,5% de amidoschwarz în acid acetic 5%, pentru colorarea proteinelor. Decolorarea fondului se face într-o baie de acid acetic 5% care se reîmprospătează din cînd în cînd.

7. *Electroforeza izoenzimelor lactat dehidrogenazei* s-a efectuat pe plăci de 7 × 2,5 cm, în gel de agaroză 1,5% (3 ml soluţie caldă de agaroză 1,5% pe placă), timp de 2 ore la 120 V şi 3 mA/placă, folosind o soluţie tampon de veronal-medinal, pH = 8,6. După terminarea migrării, izoenzimele au fost identificate şi localizate după tehnica dată de I.H. Fine şi L.A. Castello [21]. Activitatea lactat dehidrogenazică s-a determinat atît în extractul proteic ca atare, cît şi în cel tratat cu sare cuaternară, după îndepărtarea prin centrifugare a complexului rezultat şi o prealabilă dializă pentru îndepărtarea sării cuaternare din supernatant.

8. *Substanţele curarizante folosite* în această lucrare pentru studiul comportării proteinelor cerebrale au fost cele folosite şi în cazul proteinelor serice şi musculare, şi anume: derivaţi de la stilben de tipul clorurilor de 4-dimetil-alchil-amoniu-stilben (alchil = metil, etil, butil, octil, cetil), derivaţi de la stilben de tipul diclorurilor de 2,4-bis (trimetilamoniu)-stilben, sintetizate şi descrise într-o lucrare anterioară de unul dintre noi [1], precum şi unele săruri cuaternare de amoniu, folosite ca relaxanţi musculari, în clinică, cum sînt: d-tubocurarina, succinilcolina şi decametoniul.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Prin adăugarea unei soluţii 3% de clorură de 4-trimetil-amoniu-stilben peste extractul proteic din creier de broască (concentraţia proteică 1,2—1,5%) se constată, după scurt timp, o separare de flocoane fine care cu timpul se depun. Analizînd supernatantul probei centrifugate, prin electroforeză pe hîrtie (fig. 1 şi 2), se constată, faţă de extractul netratat, lipsa fracţiunilor proteice cu viteză mare de migrare electroforetică.

Astfel, în timp ce extractul martor, netratat, prezintă un număr de 9 fracţiuni proteice, în care 7 sînt bine individualizate — număr asemănător cu cel găsit de M. Şerban în cadrul unui studiu al proteinelor cerebrale acvosolubile în filogenie [22] — la extractul tratat dispar primele două fracţiuni cu viteza de migrare electroforetică cea mai mare (fig. 3 a).

Analizînd precipitatul rezultat prin tratarea extractului cerebral cu sarea cuaternară de amoniu, se constată că el este de natură proteică şi prezintă fluorescenţa caracteristică a sării cuaternare de amoniu derivate de la stilben. Înseamnă că sarea cuaternară de amoniu a reacţionat selectiv cu aceste două fracţiuni, prin formare de complecşi proteină-sare cuaternară de amoniu, fără să-şi piardă fluorescenţa. Ca şi în cazul proteinelor serice [2] şi musculare [3], sarea cuaternară a reacţionat, deci, prin sarcina sa pozitivă de la atomul de azot cuaternar, cu sarcinile negative ale moleculei proteice, determinînd, prin partea sa hidrofobă, îndreptate spre în afară, o reducere considerabilă a solubilităţii, ceea ce duce la precipitarea complexului. O comportare similară se constată şi în cazul proteinelor cerebrale de la şobolan (fig. 2). Această specie fiind situată însă pe o treaptă de evoluţie filogenetică mai ridicată, electroforegrama proteinelor acvosolubile ale creierului de şobolan este mai complexă, prezentînd un număr de 12 fracţiuni, dintre care 9 bine individualizate (fig. 2 şi 3b), fapt în deplină concordanţă cu datele prezentate de

M. Șerban în lucrarea deja citată [22], și cu cele obținute de G. Hofmann și H. Schinko [23]. Și de data aceasta reacționează în mod selectiv cu sarea cuaternară de amoniu doar fracțiunile proteice cu viteză mare de migrare electroforetică, și anume primele două fracțiuni integral, iar cea de-a treia, antepenultima, aproape integral.

Glucidogramele obținute atît pentru glicoproteinele neutre, cît și pentru cele acide nu dau indicații suplimentare : din extractul tratat lipsesc aceleași fracțiuni, ca și în cazul proteinogramelor.

Datele obținute la electroforeza în gel de poliacrilamidă a extractelor proteice din creierul de broască și șobolan, tratate sau netratate cu sarea cuaternară, confirmă cele observate în cazul electroforezei pe hîrtie, în sensul că și de data aceasta se observă, pentru o concentrație de 3% a soluției sării cuaternare, dispariția practic completă a primelor două fracțiuni proteice cu viteză mare de migrare electroforetică, fără ca celelalte fracțiuni să sufere vreo modificare în concentrația lor sau în viteza lor de migrare (fig. 4). Prezența totuși, pe electroforegramă a unor urme din penultima fracțiune, la ambele extracte proteice tratate, s-ar putea explica, poate, printr-o eterogenitate a proteinelor din această fracțiune, doar o parte din ele reacționînd cu sarea cuaternară. Acest fapt rezultă dealtfel și din electroforegramele obținute pe hîrtie (fig. 3), cu singura deosebire că în cazul extractului din creier de șobolan fracțiunea antepenultimă este cea care reacționează, doar parțial cu sarea cuaternară. Prin această comportare proteinele cerebrale se deosebesc oarecum de cele serice și musculare, dintre care doar cîte o singură fracțiune proteică reacționează selectiv cu sărurile cuaternare de amoniu de tipul pahicurarelor.

Complexul sării cuaternare cu proteinele cerebrale, separat în ambele cazuri sub formă de flocoane fluorescente, este stabil, insolubil în apă și soluții saline și poate fi izolat, purificat și se scindează cu soluții diluate de hidroxid de sodiu (0,25—0,5 N), în părțile sale componente. Analizînd electroforetic soluția obținută prin dizolvarea complexului cu hidroxid de sodiu, după o prealabilă dializă la rece față de apă distilată, pentru îndepărtarea hidroxidului și a sării cuaternare eliberate din complex, componenta proteică migrează sub forma unui spot unitar compact (fig. 5) care dă o reacție pozitivă și cu albastru de toluidină, fapt ce indică prezența glicoproteinelor în această fracțiune.

Obținerea doar a unui singur spot s-ar putea explica printr-o mascare a celei de-a doua fracțiuni proteice, prezentă într-o concentrație mult mai mică și prin viteza de migrare electroforetică apropiată a celor două fracțiuni.

O comportare interesantă și asemănătoare cu cea observată și în cazul extractului proteic din mușchii striați de șobolani [5] s-a constatat la determinarea activității lactat dehidrogenazice a extractului proteic cerebral tratat cu sarea cuaternară. Comparînd enzimograma extractului martor cu cea a supernatantului obținut de la extractul tratat, în urma îndepărtării prin centrifugare a complexului separat, se constată (fig. 6 a și b) o slăbire considerabilă a primului spot anodic de lîngă linia de start, o absență aproape totală a celui de-al doilea spot anodic și o slăbire netă a celui de-al treilea spot. În cazul enzimogramei de la broască se constată o slăbire și a ultimului spot anodic spre deosebire de enzimo-

grama extractului proteic cerebral şi muscular de şobolan. Aceste rezultate indică şi în cazul extractelor proteice cerebrale o preferinţă deosebită a sării cuaternare de amoniu pentru hibrizii tipului H şi M ai izoenzimelor lactat dehidrogenazei.

Un rol important în formarea complexului îl joacă, după cum rezultă din tabela 1 şi din fig. 1 şi 2, concentraţia soluţiei sării cuaternare de

Tabela 1

Influenţa concentraţiei soluţiei sării cuaternare de amoniu (clorura de 4-trimetil-amoniu-stilben) asupra formării complexului cu proteinele cerebrale de la broască şi şobolan

Concentraţia soluţiei (%)	Schimbările observate la extractele proteinelor cerebrale tratate cu soluţia sării cuaternare de amoniu (în raport de 1 : 1)		Cantitatea complexului depus după centrifugare	Cantitatea complexului fluorescent rămas pe start a electroforegramei
	după 5 min	după 60 min		
0,05	nici o modificare	nici o modificare	—	—
0,1	foarte slab opalescent	slab opalescent	—	—
0,5	puternic opalescent	flocoane foarte fine	(+)	—
1	flocoane fine în suspensie	flocoane cu tendinţă de depunere	++	—
3	flocoane abundente cu tendinţa de depunere	flocoane abundente depuse	++++	(+)
5	flocoane abundente mari depuse	flocoane abundente mari depuse	++++	++
8	flocoane fine în suspensie (ca la 1%)	flocoane fine depuse	++	++++

amoniu adăugate extractului cerebral. Astfel, dacă la o concentraţie de 0,05—0,1% practic nu se observă vreo schimbare în extractul proteic, cel mult o foarte slabă opalescenţă, începînd cu o concentraţie de 0,5%, are loc separarea de complecşi sub formă de flocoane fine, care ating cantitatea maximă la o concentraţie de 3—5%. Mărind şi mai mult concentraţia sării cuaternare de amoniu adăugate extractului cerebral, de pildă la 8%, cantitatea complecşilor separaţi sub formă de flocoane se micşorează formîndu-se în schimb — începînd deja de la o concentraţie de 3% — cantităţi crescînde de complecşi fluorescenţi solubili, care în cazul electroforezei nu migrează şi rămîn pe linia lor de aplicare. Şi în această privinţă se constată un paralelism de comportare între proteinele ţesutului cerebral şi cele musculare şi sanguine, cu singura deosebire însă că, datorită structurii şi compoziţiei lor mai deosebite, în cazul proteinelor cerebrale, coexistă chiar la concentraţii mari de săruri cuaternare de amoniu complecşi insolubili pe lîngă cei solubili.

Mecanismul de formare al acestor complecşi insolubili şi solubili s-ar putea explica, întocmai ca şi în cazul complecşilor care se formează între sărurile cuaternare de amoniu şi anumite fracţiuni ale proteinelor serice şi musculare [24], în modul arătat de J. Polonowski pentru cazul

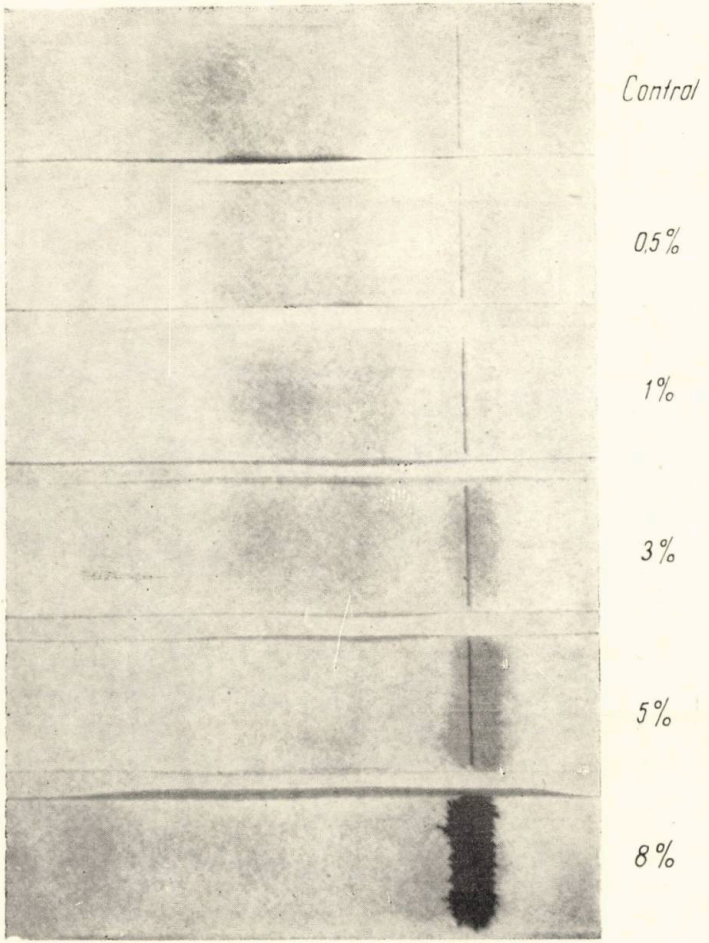


Fig. 1. — Electroforegramele supernatantului extractului proteic din creier de broască tratat cu soluţii de concentraţii crescînde de clorură de 4-trimetil-amoniu-stilben. Amănunte de tehnică sînt date în partea experimentală.

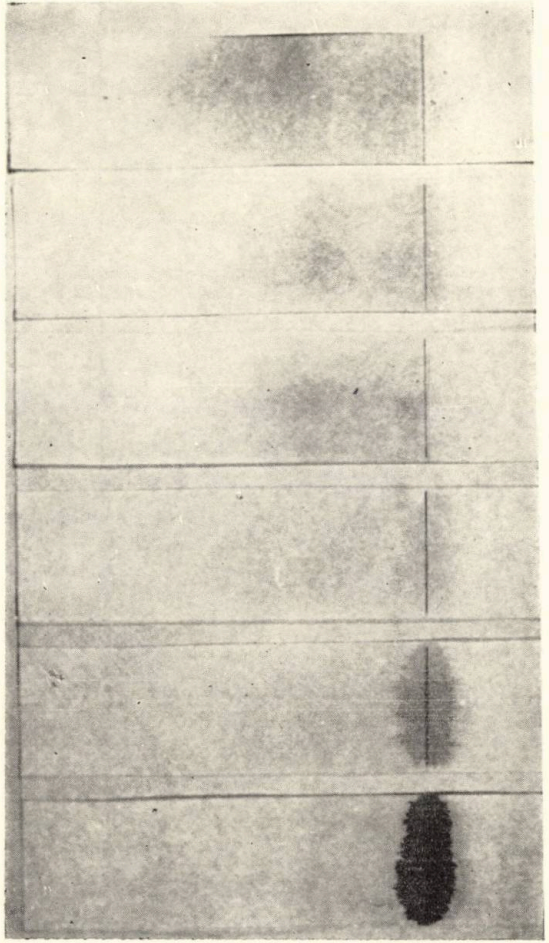


Fig. 2. — Electroforegramele supernatantului extractului proteic din creier de şobolan tratat cu soluţii de concentraţii crescînde de clorură de 4-trimetil-amoniu-stilben. Amănunte de tehnică vezi partea experimentală.

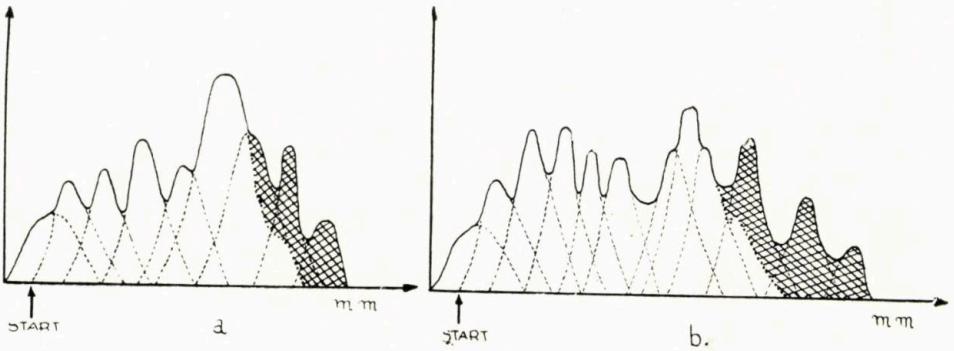


Fig. 3. — Diagramele de eluţie ale electroforegramelor extractelor proteice din creier de broască (a) şi de şobolan (b). Porţiunea haşurată reprezintă fracţiunile proteice care reacţionează cu sărurile cuaternare de amoniu prin formare de complecşi insolubili.

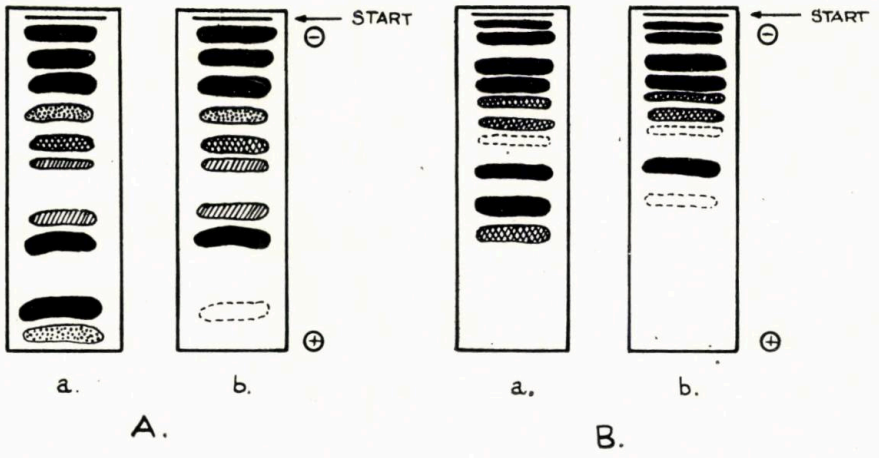


Fig. 4. — Electroforeza pe gel de poliacrilamidă a extractului proteic cerebral de broască (A) şi de şobolan (B), înainte (a) şi după tratare (b) cu o soluţie 3% de clorură de 4-trimetil-amoniu-stilben şi îndepărtare prin centrifugare a complexului format.

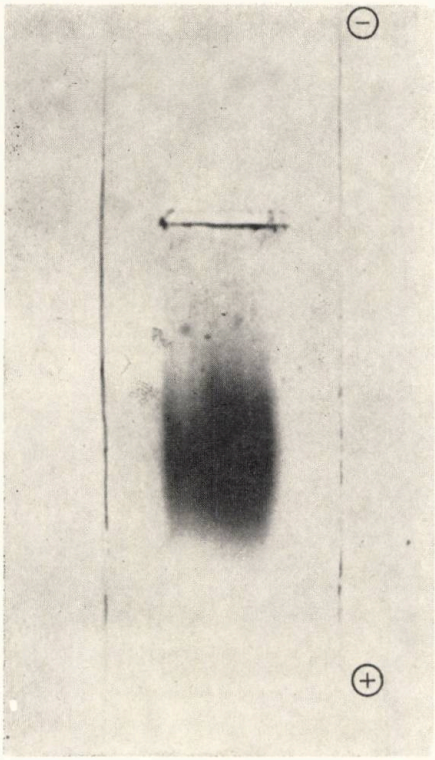
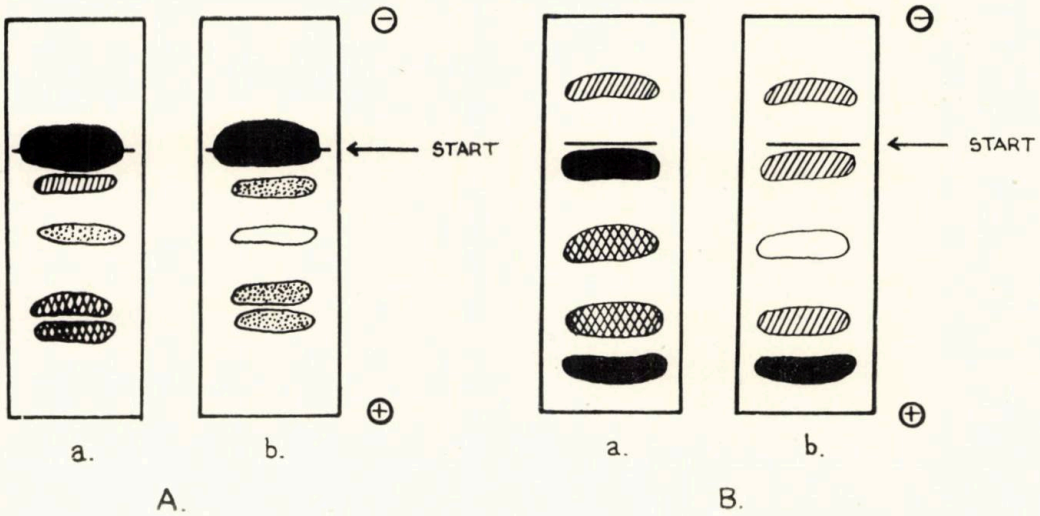


Fig. 5. — Proteinograma complexului dintre proteinele cerebrale de broască şi sarea cuaternară de amoniu în urma scindării sale cu o soluţie diluată de hidroxid de sodiu.

Fig. 6. — Activitatea lactat dehidrogenazică a extractului proteic din creier de broască (A) şi de şobolan (B), netratat (a) şi tratat (b) cu sarea cuaternară de amoniu, determinată după o prealabilă separare electroforetică pe gel de agaroză.



unor complecși între proteine și unele săpunuri cationice [25]. Complecșii insolubili ar putea lua naștere prin legături saline. Sarea cuaternară de amoniu se fixează cu partea ei polară de grupările acide ale proteinei, orientîndu-și partea ei apolară, lipofilă, spre exterior, ceea ce duce la scăderea solubilității și precipitarea complexului. La concentrații mai ridicate de sare cuaternară de amoniu, moleculele sării aflate în exces sînt atrase prin forțe van der Waals de grupările apolare, acvofobe, de pe suprafața complexului, îl înconjoară îndreptîndu-și de data aceasta grupările lor polare, acvofile, înspre afară, ceea ce duce la formarea de complecși solubili. Legăturile care se realizează în felul acesta sînt relativ slabe. Astfel, prin introducerea complexului solubil într-un cîmp electric sau prin simpla dializă față de apa distilată, moleculele sării cuaternare sînt smulse de pe suprafața complexului solubil, separîndu-se din nou complexul insolubil, cu aspectul lui caracteristic de flocoane fine, albicioase. În felul acesta se explică și spotul proteic fluorescent rămas pe linia de start. Complecșii solubili fiind încărcați pozitiv ar fi trebuit să se deplaseze în cursul electroforezei spre catod. Faptul că pe linia de start rămîne totuși un spot proteic fluorescent indică o desfacere a complecșilor solubili sub acțiunea curentului electric, prin smulgerea moleculelor sării cuaternare de amoniu mai labil legate de suprafața lor, rămînînd fixate doar acele molecule de sare cuaternară care sînt legate mai puternic de proteină prin legături saline, electrostatice, și care, neutralizînd cu sarcinile lor pozitive pe cele negative ale moleculei proteice, fac ca aceasta să nu mai migreze în cîmpul electric.

Observațiile făcute în cazul clorurii de 4-trimetil-amoniu-stilben sînt valabile pentru întreaga serie omoloagă, și anume pentru toate clorurile de 4-dimetil-alchil-amoniu-stilben, unde alchil poate fi metil, etil, butil, octil și cetil, de asemenea și pentru d-tubocurarină, substanțe care aparțin pahicurarelor. Cu leptocurarele, cărora le aparțin derivați de tipul diclorurilor de 2, 4-bis(trimetil-amoniu)-stilben, decametoniul și succinilcolina, proteinele cerebrale nu reacționează deloc, comportîndu-se în această privință, din nou, în mod identic cu proteinele serice și musculare. Și în cazul proteinelor cerebrale se confirmă deci constatarea făcută de noi [24] că, pentru a reacționa cu proteinele prin formare de complecși, nu este suficient ca agentul curarizant să posede în molecula lui una sau mai multe grupări cuaternare de amoniu, ci el mai trebuie să îndeplinească anumite condiții sterice care imprimă și natura mecanismului său de acțiune.

CONCLUZII

1. Dintre numeroasele fracțiuni ale proteinelor acvosolubile cerebrale reacționează în mod selectiv cu sărurile cuaternare de amoniu fluorescente derivate de la stilben, de tipul clorurilor de 4-dimetil-alchil-amoniu-stilben, prin formare de complecși fluorescenți, doar fracțiunile proteice cu viteză mare de migrare electroforetică.

2. Complecșii formați, ce se prezintă sub formă de flocoane fine, pot fi izolați, purificați și scindați în părțile lor componente prin dizolvare în soluții diluate de hidroxid de sodiu.

3. Formarea de complecşi între sărurile cuaternare de amoniu şi anumite fracţiuni ale proteinelor cerebrale se observă atît la animale cu sînge rece (broască), cît şi la animale cu sînge cald (şobolan).

4. Dintre izoenzimele lactat dehidrogenazei, sărurile cuaternare de amoniu manifestă o preferinţă netă pentru hibrizii de tipurile I şi M.

5. Concentraţia soluţiei sării cuaternare de amoniu adăugate extractului proteic joacă un rol important în formarea complecşilor.

Nu toate sărurile cuaternare de amoniu utilizate în prezenta lucrare reacţionează cu proteinele cu formare de complecşi, ci numai acelea care posedă un anumit grad de lipofilie şi care aparţin pahicurarelor (de exemplu d-tubocurarina). Sărurile cuaternare de tipul leptocurarelor (de exemplu derivaţi de la stilben de tipul diclorurilor de 2,4-bis(trimetil-amoniu)-stilben, decametoniu, succinilcolină nu reacţionează la nici o concentraţie cu proteinele cerebrale, prin formare de complecşi.

7. Rezultatele obţinute în această lucrare arată că proteinele cerebrale se comportă asemănător cu proteinele serice şi musculare studiate în lucrările anterioare.

8. Proprietatea proteinelor de a reacţiona selectiv cu o serie de săruri cuaternare de amoniu, prin formare de complecşi, este deci o însuşire mai generală a lor, nelegată neapărat de o proteină specifică a unui anumit ţesut (cum ar fi, de pildă, receptorul specific al acetilcolinei).

Prezentat la redacţie
la 10 iulie 1972

Institutul de biochimie
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. H. D. Schell, St. cercet. chim., **4**, 681 (1961).
2. H. D. Schell, St. cercet. biochim., **4**, 505 (1961).
3. H. D. Schell, St. cercet. biochim., **6**, 545 (1963).
4. H. D. Schell, St. cercet. biochim., **13**, 183 (1970).
5. H. D. Schell, D. Tănăsescu, Rev. roum. Biochim., **6**, 163 (1969).
6. H. D. Schell, St. cercet. biochim., **6**, 61 (1963).
7. S. Ehrenpreis, Science. **129**, 1613 (1959).
8. S. Ehrenpreis, Biochim. Biophys. Acta, **44**, 561 (1960).
9. S. Ehrenpreis, M. G. Kellock, Biochem. Biophys, Research Communs, **2**, 311 (1960).
10. A. Hassón, C. Chagas, Biochem. Biophys. Acta, **36**, 301 (1959).
11. A. Hassón, J. Yon, Biochem. Biophys. Acta, **50**, 389 (1961).
12. A. Hassón, Biochem. Biophys. Acta, **56**, 275 (1962).
13. K. E. Neet, S. L. Friess, Arch. Biochem. Biophys., **99**, 484 (1962).
14. S. Ehrenpreis,Science, **136**, 175 (1962).
15. S. Ehrenpreis, J. H. Fleisch, Th. Mittag, Pharmacol. Rev., **21**, 131 (1969).
16. I. Manta, AL. Ciplea, Metodele laboratorului clinic, Cluj, „Cartea Românească", ed. a II-a, 1947, p. 94.
17. S. Midu, S. Câmpeanu, *Electroforeza*, Bucureşti, Edit. medicală, 1957, p. 70.
18. E. Benhamon, I. Pugliese, J. C. Chiche, P. Arnouch, Presse méd., **63**, 441 (1954).
19. L. P. Akroyd, Analyt. Biochem., **19**, 399 (1967).
20. D. Tănăsescu, N. Moldoveanu, St. cercet. biochim., **13**, 313 (1968).
21. I. H. Fine, L. A. Castello, în „Methods in Enzymology", Acad. Press., New York, **6**, 958 1(963).

22. M. Șerban, St. cercet. biochim. **2**, 309 (1959).
23. G. Hofmann, H. Schinko, Klin. Wchsch, **34**, 86 (1956).
24. H. D. Schell, St. cercet. biochim., **10**, 337 (1967).
25. J. Polonovski, Ann. Chim., 671 (1950).

INTERACTION OF BRAIN PROTEINS WITH SOME FLUORESCENT AMMONIUM QUATERNARY SALTS DERIVED FROM STILBENE

SUMMARY

The study of interactions between rat and frog brain water-soluble proteins and some fluorescent ammonium quaternary salts derived from stilbene, as well as some ammonium quaternary salts with clinical use as muscle relaxants (d-tubocurarine, succinylcholine, decamethonium) has shown that some of the investigated salts, namely those of pachycurara type, form complexes with certain brain protein fractions.

The fluorescent complexes, in the case of stilbene derivatives, are amorphous flocules which may be isolated, purified and cleaved into their component parts : protein and quaternary salt.

If the concentration of ammonium quaternary salts, added to brain protein extracts, increases over 3%, soluble complexes occur; in an electrical field or by dialysis, they are easily converted to the above mentioned insoluble complexes by losing the exceeding ammonium quaternary salt which is fixed on their surface by weak bonds.

Experimental results show that brain proteins no matter of the animal evolutionary degree have a similar behaviour with that of serum and muscle proteins with respect to ammonium quaternary salts under investigation.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 1, 71–81 (1973)

CONTRIBUȚII LA STUDIUL CHEMOTAXONOMIC AL ORD. *ERICALES*. III. Flavonoidele

M. TĂMAȘ

Rezumat. — S-au studiat, prin cromatografie pe hîrtie și în strat subțire glicozidele flavonice, flavonolii și leucoantocianii de la 22 specii indigene ale ord. *Ericales*, în vederea precizării și lămuririi poziției sistematice a unor taxoni în interiorul ordinului.

Pe baza răspîndirii și naturii compușilor flavonici se aduc contribuții la caracterizarea biochimică a reprezentanților indigeni ai ord. *Ericales* și precizarea poziției sistematice a fam. *Empetraceae*, a gen. *Oxycoccus*, *Vaccinium* și *Empetrum* și a raportului între subfamiliile fam. *Ericaceae*.

În vederea cunoașterii compoziției chimice a plantelor indigene din ord. *Ericales* [1], între care se află și unele plante medicinale valoroase [2], [3], ne-am propus să studiem substanțele flavonoidice la aceste plante. Pe de altă parte, avînd în vedere că la nivelul ordinului se găsesc numeroase unități critice [4]—[6] și cunoscînd valoarea chemotaxonomică a flavonoidelor, ne-am propus să stabilim și valoarea chemotaxonomică a acestora cu care să aducem argumente de natură biochimică la lămurirea poziției sistematice a unor taxoni.

Într-adevăr, valoarea chemotaxonomică a flavonoidelor este unanim recunoscută, fiind considerate indicatori taxonomici de prim rang, datorită faptului că au o largă răspîndire botanică, o mare variabilitate de structură, o bună stabilitate metabolică și permit o identificare rapidă și ușoară [7]—[11].

Pînă în prezent nu au mai fost efectuate cercetări chemotaxonomice la ord. *Ericales*, pe baza studiului comparativ al flavonoidelor, ci numai cercetări izolate asupra flavonelor din frunzele unor Ericale, cercetări determinate de importanța medicinală a flavonelor, cunoscîndu-se acțiunea lor ca factor P, sau al permeabilității, proprietățile diuretice, hipotensive, hemostatice și antihistaminice [12].

Astfel Hegnauer [13] arată că la *Ericaceae* sînt răspîndite în primul rînd quercetina și derivații săi, precum și glicozidele kempferolului și miricetolului. Au fost studiate flavonoidele din frunzele de *Ledum palustre* L. [14], *Arctostaphylos uva-ursi* L. Spr. [3], *Vaccinium vitis idaea* L. [15], [16], *V. myrtillus* L. [17], *Chimaphila umbellata* (L.) Nutt. [18], *Empetrum nigrum* L. [13] și *E. hermaphroditum* (Lge.) Hagerup [19].

MATERIAL ȘI METODĂ

Studiul flavonoidelor s-a efectuat pe frunze provenite de la 22 specii de ericale, recoltate din diferite locuri din țară (tabela 1). Materialul vegetal a fost uscat și apoi măcinat în vederea obținerii unei pulberi fine, care s-a păstrat în pungi de polietilenă.

În prima etapă punerea în evidență a flavonelor s-a făcut prin tehnica cromatografiei circulare pe hîrtie, după Grigorescu [20], [21]: 0,5 g pulbere vegetală se extrage cu 10 ml metanol, într-un balon la reflux, timp de 30 min pe baia de apă. Soluția fierbinte se filtrează și se aduce la 10 ml cu metanol, obținînd astfel o soluție 5 %, care se supune analizei cromatografice circulare preliminară, folosind ca sistem de solvenți amestecul metanol-acid acetic-apă (4 : 0,25 : 6), iar identificarea succesivă în vapori de amoniac, $AlCl_3$ 5 % în etanol, atît la lumina zilei, cît și în UV (după [22]—[24]) (fig. 1).

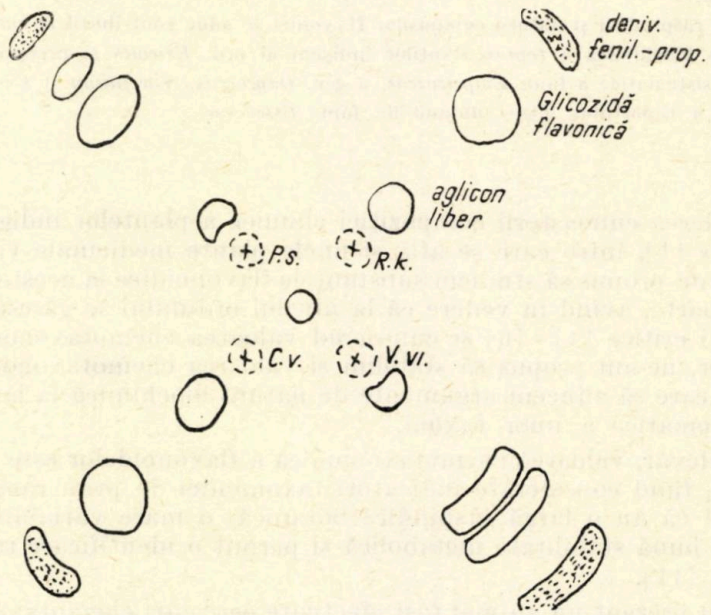


Fig. 1. — Cromatograma pe hîrtie, în sistem circular a flavonelor din frunzele de *Pirola secunda* (P.s.), *Rhododendron kotschyi* (R.k.), *Calluna vulgaris* (C.v.) și *Vaccinium vitis idaea* (V.vi.) Sistem de solvenți: Metanol-acid acetic-apă (4 : 0,25 : 6). Identificare : $AlCl_3$ (UV).

În etapa a doua, glicozidele flavonice, puse în evidență în prima etapă, s-au separat prin tehnica cromatografiei preparative pe hîrtie în același sistem de solvenți, pe hîrtie SS 2040 a și identificare în vapori de amoniac, la lumina zilei și UV. Zonele circulare corespunzătoare glicozidelor flavonice au fost decupate și extrase separat cu metanol, la cald. Soluțiile astfel obținute s-au concentrat și apoi cromatografiat pe hîrtie

Tabela 1

Speciile de ericale studiate, locul şi data recoltării

		Nr. crt.	Specia	Locul recoltării	Data (anul, luna)
Fam. *Pirolaceae*		1	*Pirola uniflora* L.	Valea Drăganului, Tuşnad	1969 (VI) 1970 (VII)
		2	*P. secunda* L.	Izv. Mureş, Tuşnad	1970 (VII)
		3	*P. minor* L.	Mt. Vlădeasa	1969, 1970 (VI, IX)
		4	*P. media* Sw.	Mt. Vlădeasa	1969, 1970 (VI, IX)
		5	*P. rotundifolia* L.	Dl. Răchitiş (jud. Suceava)	1970 (IX)
		6	*Chimaphila umbellata* (L) Nutt.	Tuşnad	1970 (VII)
		7	*Monotropa hypopitys* L.	Ciucea	1970 (VIII)
Fam. *Ericaceae*	Subfam. *Rhododendroideae*	8	*Loiseleuria procumbens* (L.) Desv.	M-ţii Retezat, M-ţii Rodnei	1969 (VIII)
		9	*Rhododendron kotschyi* Simk.	M-ţii Retezat, M-ţii Rodnei	1969 (VIII)
	Subfam. *Arbutoideae*	10	a) *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spr.	Dl. Răchitiş (jud. Suceava)	1970 (IX)
			b) *A. uva ursi*	Scărişoara-Belioara-(Cluj)	1969, 1970 (IX)
		11	*Andromeda polifolia* L.	Ml. Mohoş (Ciuc)	1970 (VII)
	Subfam. *Vaccinioideae*	12	a) *Vaccinium vitis idaea* L.	M-ţii Apuseni (Băişoara)	1969, 1970 (VII, IX)
			b) *V. vitis-idaea* (fructe)	M-ţii Apuseni (Răcătău)	1970 (IX)
		13	a) *Vaccinium myrtillus* L.	M-ţii Apuseni (Băişoara)	1969, 1970 (VII, IX)
			b) *V. myrtillus* (fructe)	M-ţii Apuseni (Băişoara)	1971 (VII)
		14	*Vaccinium gaultherioides* Bigel.	M-ţii Retezat, M-ţii Rodnei	1969 (VIII)
		15	*V. uliginosum* L.	M-ţii Oituz	1969 (VII)
		16	*Oxycoccus microcarpus* Turcz.	Ml. Belcești (Beliş) Ml. Mohoş	1969 (IX) 1970 (VII)
		17	*O. quadripetalus* Gilib.	Poiana Stampei	1971 (VIII)
	Subfam. *Ericoideae*	18	*Calluna vulgaris* (L.) Hull.	M-ţii Apuseni (Băişoara)	1969, 1970 (VII, IX)
		19	*Bruckenthalia spiculifolia* (Salisb.) Rchb.	M-ţii Apuseni (Băişoara)	1969, 1970 (VII, IX)
		20	*Erica carnea* L.	Grădina Botanică Cluj	1970 (IV, IX)
Fam. *Empetraceae*		21	*Empetrum nigrum* L.	Ml. Mohoş (Ciuc), M-ţii Oituz	1970 (VII)
		22	*E. hermaphroditum* (Lge.) Hagerup.	M-ţii Vrancei, M-ţii Rodnei	1967 (VII)

MN 263, tehnica ascendentă, amestecul Forestal. Identificarea s-a făcut cu $AlCl_3$ la UV (fig. 2).

Deși sistemul de solvenți menționat prezintă avantaje față de alte sisteme utilizate, totuși, petele obținute pe hîrtie nu sînt bine delimitate; după culoarea dată cu reactivii de identificare, însă, se pot face aprecieri asupra naturii glicozidelor flavonice.

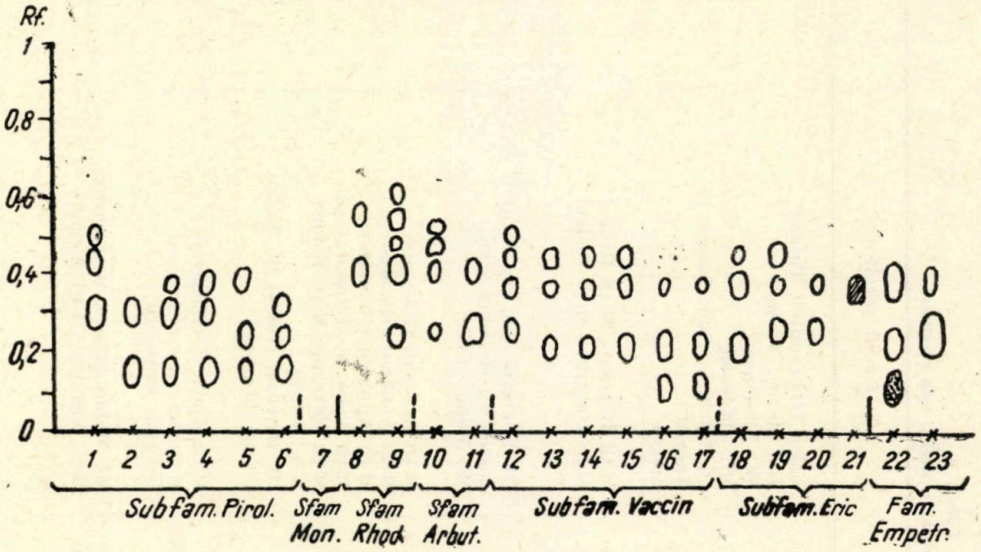


Fig. 2. — Cromatograma pe hîrtie a glicozidelor flavonice din frunzele de ericale. Numerotarea speciilor pînă la 19, după tabela 1. 20 — *Bruckenthalia spiculifolia* (flori); 21 — *Erica carnea*; 22 — *Empetrum nigrum*; 23 — *E. hermaphroditum*. Identificare: $AlCl_3$ (în lumină UV) Sistem de solvenți: acid acetic — acid clorhidric — apă (15 : 3 : 82).

— galben; roșu — brun; verde-gălbui — portocaliu.

În scopul unei mai bune separări a glicozidelor flavonice s-a efectuat și o cromatografie în strat subțire de poliamid (D 11 Merck), folosind ca sistem de solvenți amestecul apă-etanol-metil etil cetonă-acetil acetonă (9 : 3 : 3 : 1) (după [7], [8] și identificare la lumina UV (fig. 3).

În a treia etapă, cunoscînd că agliconii glicozidelor flavonice caracterizează unități sistematice mai mari decît glicozidele [25], s-a procedat la hidroliza, atît a glicozidelor, separate preparativ prin cromatografie pe hîrtie, cît și a extractelor metanolice obținute după Jay [7], cu HCl 2 N, timp de 40 min pe baia de apă la fierbere. Soluția răcită s-a reluat, în pîlnia de separare, cu eter etilic, în care trec agliconii rezultați în urma hidrolizei. Soluțiile eterice se reuneau, se spălau de mai multe ori cu apă pentru îndepărtarea urmelor de acid, se evaporau la sec și reziduul se relua într-un volum mic de metanol, care era apoi supus cromatografiei pe hîrtie Whatman 1, în sistemul Forestal pentru agliconi (tabela 2), folosind în acest caz ca substanțe etalon kempferolul, quercetolul și miricetolul.

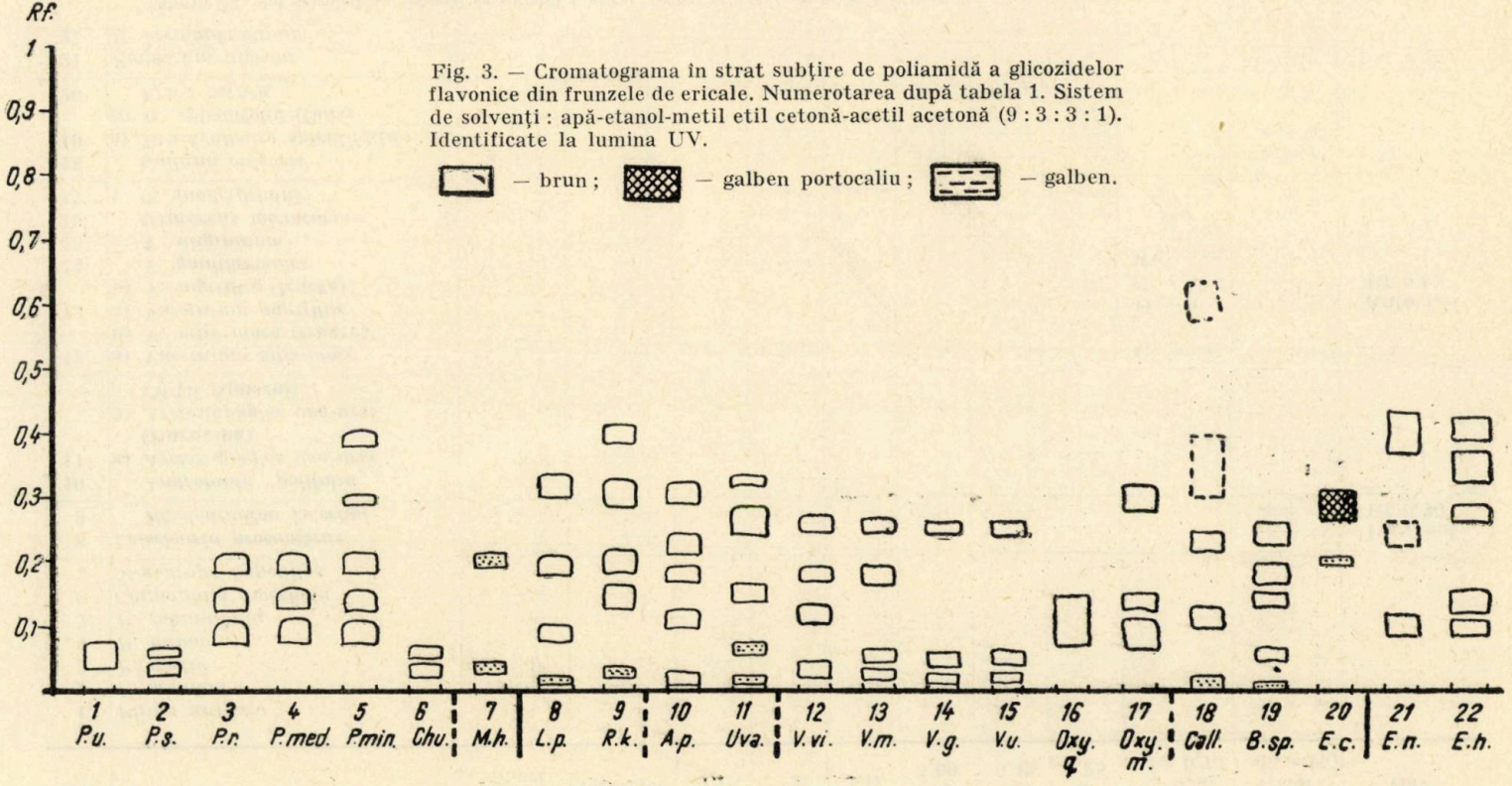


Fig. 3. — Cromatograma în strat subţire de poliamidă a glicozidelor flavonice din frunzele de ericale. Numerotarea după tabela 1. Sistem de solvenţi : apă-etanol-metil etil cetonă-acetil acetonă (9 : 3 : 3 : 1). Identificate la lumina UV.

— brun ; — galben portocaliu ; — galben.

Tabela 2

Răspîndirea derivaţilor flavonici la speciile indigene ale ord. *Ericales*

Nr. crt.	Specia	Agliconi (flavonoli) liberi	Glicozide flavonice	Leucoantociani			Flavonoli glicozidici			Antociani D 0,37 C 0,55 Mv. 0,70	Deriv. fenilpropan. (fluor. albastră)	Alţi deriv. flav.
				LP	LC	LD	K 0,60	Q 0,42	M 0,25			
1	*Pirola uniflora*	+	++	–	–	–	++	+++	–		+++	
2	*P. secunda*	++	++	–	–	–	++	++	–		++	
3	*P. media*	+	+	–	–	–	++	+++	–		+	
4	*P. minor*	+	++	–	–	–	+++	+++	–		+	
5	*P. rotundifolia*	+	++	–	–	–	+++	+++	–		++	
6	*Chimaphila umbellata*	++	+++	–	–	–	+++	+++	–		++	
7	*Monotropa hypopitys*	–	–	–	–	–	–	–	–		++	
8	*Loiseleuria procumbens*	+	++	–	+	–	–	+++	–		+++	Flavonol
9	*Rhododendron kotschyi*	+++	+++	–	++	–	++	+++	–		++	Rf 0,30
10	*Andromeda polifolia*	+	++	–	+++	–	+	+++	–		+	
11	a) *Arctostaphylos uva-ursi* (Bucovina)	++	+++	–	+	–	+	+++	–		++	
	b) *Arctostaphylos uva-ursi* (M-ţii Apuseni)	++	+++	–	+	–	+	+++	–		++	
12	a) *Vaccinium vitis-idaea*	++	++	–	+++	–	–	+++	–	C + +	++	
	b) *V. vitis idaea* (fructe)	+	++	–				++	–			
13	a) *Vaccinium myrtillus*	+	++	–	+++	–	–	+++	–	D +++	++	Antocian
	b) *V. myrtillus* (fructe)	+	++				+	+++	+	C +++		Rf 0,83
14	*V. gaultherioides*	+	++	–	+++	–	++	+++	–	Mv. ++	++	
15	*V. uliginosum*	+	++	–	+++	–	++	+++	–		++	
16	*Oxycoccus microcarpus*	+	++	–	+++	+++	–	+++	+++		++	
17	*O. quadripetalus*	+	++	–	+++	+++	–	+++	+++		++	
18	*Calluna vulgaris*	+++	+++	–	+++	–	+	+++	–		+++	
19	a) *Bruckenthalia spiculifolia*	+	++	–	+++	–	+	+++	–		+++	
	b) *B. spiculifolia* (flori)	–	++				–	++	–			
20	*Erica carnea*	–	++	–	+++	+	++	+++	–		++	
21	*Empetrum nigrum*	++	++	–	+++	–	++	++	+		++	
22	*E. hermaphroditum*	++	++	–	+++	–	++	++	–		++	

Valorile Rf. sînt calculate în sistemul de solvenţi Forestal (pentru agliconi), pe hîrtie Whatman 1.
LP = leucopelargonidină; D = delphinidină
LC = leucocianidină C = cyanidină
LD = leucodelphinidină Mv. = malvidină
K = kempferol
Q = quercetol
M = miricetol

Pentru fructele de *Vaccinium vitis idaea* și *V. myrtillus*, s-au identificat numai flavonolii rezultați în urma hidrolizei, deoarece în soluția de extracție, metanolică, trec și antocianozidele din aceste fructe, care se suprapun și maschează identificarea glicozidelor flavonice pe cromatogramă.

Soluțiile metanolice hidrolizate, din frunze, din care agliconii flavonici au fost extrași cu eter, conțin și antocianidinele rezultate din leucoantocianidine, prin oxidarea acestora în mediu acid și care dau culoarea roșie soluțiilor hidrolizate. Aceste antocianidine se extrag cu butanol, în pîlnia de separare, apoi se supun analizei cromatografice pe hîrtie Whatman 1, în sistemul Forestal pentru agliconi, aplicînd spoturi de formă liniară de 5 cm lățime și identificarea se face după valoarea Rf și culoarea petelor (după [7], [8]).

Am lucrat în aceleași condiții experimentale pentru toate speciile, pentru ca rezultatele să poată fi apreciate, aproximativ, cantitativ.

REZULTATE

Prin cromatografia preliminară pe hîrtie în sistem circular (fig. 1 și tab. 2) am pus în evidență flavonolii liberi, glicozidele flavonice și derivații fenil propanici cu fluorescență albastră. Flavonolii liberi rămîn în apropierea liniei de start, au o fluorescență galbenă în vapori de amoniac și galbenă-verzuie după revelare cu $AlCl_3$, pe cînd glicozidele flavonice, prezintă un Rf superior, fluorescență brună în amoniac și galbenă cu $AlCl_3$. Derivații fenil-propanici se găsesc în apropierea liniei de front.

Prin această metodă am pus în evidență flavonolii liberi și glicozide flavonice la toate speciile studiate, cu excepția speciei saprofite *Monotropa hypopitys* L., la care apar numai derivați fenil-propanici, despre care se știe că sînt precursori în biogeneza flavonoidelor [10], [12], [25].

În urma cromatografiei pe hîrtie a glicozidelor flavonice (fig. 2) se poate constata că pentru fiecare specie apar mai multe spoturi caracteristice flavonoidelor, care prezintă valori Rf și culori diferite de la o specie la alta. Este de remarcat culoarea spoturilor pentru glicozidele flavonice la *Erica carnea* și *Empetrum nigrum*, care virează de la portocaliu-roz la galben-verzui și, respectiv, de la brun la portocaliu în urma tratării cu amoniac și apoi $AlCl_3$ la UV.

La *Monotropa hypopitys* apare o pată de culoare roșie-brună, în apropierea liniei de front, asupra căreia nu ne putem pronunța cărei clase de substanțe îi aparține.

Rezultate mult mai bune am obținut la separarea glicozidelor flavonice în cazul cînd am utilizat cromatografia în strat subțire de poliamid (fig. 3). Examinate la UV, glicozidele flavonice au o fluorescență brună, iar flavonolii galbenă. Cu două excepții (*Pirola uniflora* și *Oxycoccus quadripetalus*), la care apare numai o singură pată, la celelalte specii sînt caracteristice un număr mai mare de spoturi, cu diferite valori Rf, de aceea ele pot fi considerate caractere de specificitate. Este de remarcat apropierea, în privința glicozidelor flavonice, a unor specii de *Pirolaceae*, ca, de exemplu *Pirola secunda* și *Chimaphila umbellata*, respectiv între *Pirola media* și *P. rotundifolia*.

În cadrul fam. *Ericaceae*, numărul și valoarea Rf a glicozidelor flavonice prezintă un grad mai mare de diversificare, unele glicozide fiind

caracteristice pentru anumite subfamilii. Nu am reușit să punem în evidență deosebiri calitative între speciile *Vaccinium uliginosum* și *V. gaultherioides*, pe cînd între alte specii critice de ericale din flora țării noastre, ca *Oxycoccus quadripetalus* și *O. microcarpus*, respectiv între *Empetrum nigrum* și *E. hermaphroditum*, deosebirile sînt evidente (fig. 3). De remarcat că la *Erica carnea* apare în strat subțire de poliamid, la fel ca în cazul cromatografiei pe hîrtie, o glicozidă cu fluorescență portocalie care se deosebește, prin aceasta, de toate celelalte glicozide evidențiate la speciile de ericale.

La specia *Monotropa hypopitys*, nu se pot evidenția nici pe această cale glicozide flavonice, ci numai două pete de nuanță foarte slabă albegălbui la UV (fig. 3), care apar atît înainte, cît și după hidroliză.

Studiind agliconii rezultați în urma hidrolizei (tabela 2), se constată că la majoritatea speciilor studiate se găsește kempferol și quercetol, cu următoarele excepții : cele două specii ale genului *Oxycoccus* conțin quercetol și miricetol, iar în frunzele de *Rhododendron kotschyi*, pe lîngă kempferol și quercetol, se mai găsește un aglicon cu valoarea Rf 0,30 de fluorescență galbenă-portocalie.

În fructe agliconii sînt reprezentați prin quercetol (pentru *Vaccinium vitis idaea*) și kempferol, quercetol și urme de miricetol (pentru cele de *V. myrtillus*).

Se observă că leucoantocianidinele, identificate prin cromatografie pe hîrtie, după transformarea lor în antocianidine, lipsesc în frunzele speciilor de *Pirolaceae* studiate și sînt prezente în toate speciile de *Ericaceae* și *Empetraceae* indigene. Leucoantocianidinele sînt reprezentate prin leucocianidină, cu excepția celor două specii de *Oxycoccus*, la care apare și leucodelfinidină în aceeași proporție, iar la *Erica carnea* numai în urme.

Fructele de *Vaccinium vitis idaea* (merișoare) conțin cianidină, pe cînd cele de *V. myrtillus* (afin) conțin delfinidină, cianidină și malvidină pe lîngă al patrulea antocian cu valoare Rf 0,83 (vezi tabela 2).

DISCUȚII

Pe baza rezultatelor obținute din analiza calitativă a flavonoidelor la speciile indigene ale ord. *Ericales*, am căutat să verificăm concordanța între caracterele biochimice și poziția sistematică a taxonilor din interiorul ordinului [26]—[32].

Este cunoscut că flavonoidele se caracterizează printr-un anumit grad de metoxilare, hidroxilare și glicozidare, de unde rezultă o mare variabilitate de structură în cadrul aceleiași clase [22] ,[24], [25].

Pe lîngă faptul că flavonele sînt indicatori taxonomici de prim rang, ele au și o valoare filogenetică, pe baza principiului că biogeneza repetă filogeneza. Astfel, cunoscîndu-se originea biogenetică a flavonoidelor și ordinea transformării unui tip în altul, de exemplu A→B→C→D, fiind verificată experimental, și dacă relațiile biogenetice repetă ordinea apariției lor în cursul dezvoltării istorice a speciilor, un organism care posedă compusul D va fi mai evoluat decît acela care are componentul B [7], [8].

Avînd la bază principiile de evoluție biochimică și relația între distribuția flavonoidelor în funcție de poziția sistematică a plantelor, s-au putut stabili următoarele caractere ale flavonoidelor : prezența flavono-

lilor, leucoantocianilor, derivaţilor fenil-trihidroxilici, prezenţa derivaţilor C-substituiţi (C-metilare, C-glicozidare, biflavone) denotă caractere de primitivitate, iar prezenţa de compuşi 6,8-hidroxilaţi, 2′-hidroxilaţi, O-metilaţi, dispariţia flavonolilor şi înlocuirea lor cu flavone, dispariţia leucoantocianilor, dispariţia derivaţilor fenil-trihidroxilici denotă caractere evolutive [7], [8].

În ce priveşte speciile indigene ale ord. *Ericales*, se poate constata că glicozidele caracterizează în general specia, existînd o asemănare între două specii, numai în trei cazuri: *Pirola secunda* şi *Chimaphila umbellata*, *P. rotundifolia* cu *P. media* şi *Vaccinium gaultherioides* cu *V. uliginosum*. Cele două specii de *Vaccinium* din flora ţării noastre, recent separate [4], nu au putut fi diferenţiate din punctul de vedere al flavonelor.

Referitor la genul *Oxycoccus*, care, pînă nu demult [1], [26], era considerat o specie sau subgen al genului *Vaccinium*, rezultatele noastre aduc un argument de natură biochimică care pledează atît pentru separarea genului *Oxycoccus* de genul *Vaccinium*, aşa cum este considerat azi de majoritatea sistematicienilor, cît şi în privinţa deosebirilor între cele două specii studiate ale genului *Oxycoccus*. Între cele două genuri există deosebiri în sensul că *Oxycoccus* prezintă miricetol şi leucodelfinidină, iar *Vaccinium* nu; între cele două specii ale genului *Oxycoccus* există deosebiri în privinţa glicozidelor flavonice (fig. 3).

De asemenea între cele două specii de *Empetrum*, între care *E. hermaphroditum* a fost recent descoperit în flora României [6], deosebirile în privinţa glicozidelor flavonice sînt evidente, valoarea lor chemotaxonomică pentru aceste două specii fiind tratată într-o altă lucrare [33].

În cadrul fam. *Ericaceae* se poate observa un grad mai mare de diversificare atît a glicozidelor, cît şi a agliconilor, în comparaţie cu fam. *Pirolaceae*, care se prezintă, sub acest aspect, mai unitară, aşa cum a rezultat şi din cercetările privitoare la răspîndirea glicozidelor fenolice [34] — [36].

Agliconii din frunzele de ericale diferă însă mai puţin decît formele glicozidate, găsindu-se numai trei tipuri de agliconi (tabela 2), ceea ce înseamnă că glicozidele se diferenţiază între ele, datorită, mai mult, părţii glucidice. Chiar şi reprezentanţii fam. *Empetraceae* a cărei poziţie sistematică a fost mult controversată [28]—[32], se încadrează, din punctul de vedere al flavonoidelor, în tipul caracteristic ordinului.

În ceea ce priveşte raportul cantitativ între diferiţi agliconi, remarcăm că la *Pirolaceae* quercetolul şi kempferolul se găsesc în proporţii egale, la *Ericaceae*, predomină quercetolul, cu excepţia genului *Oxycoccus*, la care apare quercetol şi miricetol în proporţii egale; cele două specii de *Empetrum* conţin în proporţii egale kempferol şi quercetol (tabela 2).

În legătură cu prezenţa miricetolului şi a leucodelfinidinei la *Oxycoccus*, care trădează un anumit grad de primitivism [7], [8], se poate presupune că acest gen este mai vechi şi mai puţin evoluat decît celelalte genuri ale ordinului şi care s-a putut conserva în condiţiile vegetaţiei din mlaştinile de turbă.

Prezenţa unei glicozide flavonice deosebite la *Erica carnea*, îndepărtează subfam. *Ericoideae* de primele trei subfamilii ale familiei *Ericaceae*, pe cînd *Vaccinioideaele* par mai apropiate de *Arbutoideae*, aşa cum am putut deduce şi din studiul glicozidelor fenolice [34], [35].

Avînd în vedere că prezența leucoantocianilor indică caractere de primitivitate și că pierderea lor este ireversibilă [7], [8], atunci fam. *Pirolaceae* apare mai evoluată decît fam. *Ericaceae* cu care poziție, însă, este de acord numai Tahtadjian [32], toți ceilalți sistematicieni plasînd *Pirolaceaele* înaintea *Ericaceaelor* [26]—[31].

CONCLUZII

Frunzele plantelor indigene ale ord. *Ericales* conțin flavonoli liberi, glicozide flavonice și leucoantociani, cu excepția speciei saprofite *Monotropa hypopitys*. Flavonolii sînt reprezentați prin kempferol, quercetol și miricetol, iar leucoantocianii prin leucocianidină și leucodelfinidină.

Familiile, subfamiliile și genurile se pot caracteriza prin agliconii flavonozidici, iar speciile prin glicozide flavonice.

După distribuția și natura compușilor flavonici, s-au făcut interpretări chemotaxonomice asupra unităților sistematice din interiorul ordinului.

S-au adus contribuții de natură biochimică la lămurirea poziției sistematice a fam. *Empetraceae*, a unor specii ale genului *Oxycoccus Vaccinium* și *Empetrum*, precum și a raportului dintre familiile și subfamiliile din cadrul ordinului.

Se poate aprecia că flavonoidele au o ridicată valoare chemotaxonomică pentru taxonii ord. *Ericales*.

Prezentat la redacție
la 4 martie 1972

Disciplina de botanică farmaceutică
Facultatea de farmacie
Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. *** *FLORA R.P.R.*, vol. **VII**, București, Edit. Academiei, 1960.
2. T. Goina și colab., *Farmacognozie*, București, Ed. didactică și pedagogică, 1967.
3. R. Benigni, C. Capra, P. E. Cattorini, *Pianti medicinali*, vol. II, *Inverni della Beffa*, Milano, 1964, p. 959, 1640.
4. D. Löwe, N. Boscaiu, Rev. roum. biologie (Ser. de Botanique), **11**, 295 (1966).
5. M. Șerbănescu, Bul. St. Acad. R.P.R., Secția St. Biol. Geol. Geogr. **5**, 1 (1953).
6. C. E. Vicol, E. Schneider-Binder, Gh. Coldea, Contrib. Bot. (Cluj) 455 (1967).
7. M. Jay, *Contribution biochimique à la connaissance taxinomique et phylogénetique des Saxifragaceae*, These, Fac. Sci., Univ. de Lyon, 1969.
8. B. Voirin, *Recherches chimiques et physiologique sur les flavonoïdes des Pteridophytes*. These, Fac. de Sci. Univ. Lyon, 1970.
9. T. Swain, *Chemical plant taxonomy*, Acad. Press, London-New York, 1963.
10. T. Swain, Comparative phytochemistry, Acad. Press, London-New York, 1966.
11. E. Pop, V. Soran, Natura, **23**, 3 (1971).
12. E. Grigorescu, *Curs de farmacognozie*, Iași, 1969 (lito. IMF, Iași).
13. R. Hegnauer, *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Bd. IV, Birkhauser Verl. Bassel u. Stuttgart, 1966, p. 65, 450.
14. H. Krug, W. Olechnowich-Stepien, Diss. Pharm., **17**, 213 (1965).
15. J. Kaminska, A. Maraszek-Truszcinska, Farmacia Polska, 440 (1965).

16. J. KAMINSKA, Diss. Pharm. Pharmacol., **18**, 267 (1966).
17. C. H. ICE, S. H. WENDER, J. Amer. Chem. Soc., **75**, 50 (1953).
18. K. SHETH, PH. CATALFOMO, L. A. SCIUCHETTI, D. FRENCH, Lloydia, **30**, 78 (1967).
19. V. A. BANDIUKOVA, A. SINKARENKO, Farm. Jurnal (Kiew) **6**, 37 (1965).
20. E. GRIGORESCU, Farmacia, **10**, 353 (1962).
21. E. GRIGORESCU, Farmacia, **16**, 459 (1968).
22. T. A. GEISMAN, *The chemistry of flavonoid compounds*, Pergamon Press, Oxford, Londra, New York, Paris, 1962, p. 51.
23. M. R. FARNSWORTH, J. Pharm. Sci., **55**, 225 (1966).
24. T. J. MABRY, H. R. MARKHAM, M. B. THOMAS, *The systematic identification of flavonoids*, Springer V., Berlin-Heidelberg-New York, 1970.
25. J. B. HARBORNE, *Biochemistry of phenolic compounds*, Acad. Press London-New York, 1964.
26. AL. BORZA, *Clasificarea regnului vegetal*, Cluj, 1946 (litogr.).
27. AL. BUIA, A. NYARADY, M. RAVARUT, *Botanica agricolă*, vol. II. *Sistematica plantelor*, Bucureşti, Edit. agrosilvică, 1965.
28. M. CHADEFAUD, L. EMBERGER, *Traité de Botanique sistematique*, Vol. I, Ed. Masson & C-ie, Paris (1960).
29. A. ENGLER, *Sylabus der Pflanzenfamilien*, Gebrude Borntrag. Berlin (1964).
30. E. GHISA, *Curs de plante superioare*, fasc. I. Cluj, 1953 (litogr.).
31. R. SOO, *Felödestörtenety növenrendszertan*, Ed. III, Tankönykiado Budapest (1965).
32. A. L. TAHTADJIAN, *Sistematika i filogenia ţvetcovîh rastenii*. Izd. Nauk, Moskva-Leningrad, 1966.
33. M. TĂMAŞ, Rev. roum. Biochim., **9**, 255 (1972).
34. M. TĂMAŞ, Revista medicală (Tg. Mureş), **17**, 77 (1971).
35. M. TĂMAŞ, Revista medicală (Tg. Mureş), **17**, 202 (1971).
36. M. TĂMAŞ, Abstracts, Internat Sympos. Phytochemistry of the Balkan Flora, Varna, 1971, p. 22 B.

CONTRIBUTIONS TO THE CHEMOTAXONOMIC STUDY OF *ERICALES*. III. FLAVONOIDS

SUMMARY

The flavone glicosides, flavonols and leucoanthocyanines in 22 indigeneous species of the *Ericales* order were studied, by paper and thin-layer chromatography, in order to specify and elucidate the systematical position of some taxons within the order.

On the basis of the occurrence and nature of flavone derivatives, contributions are brought to the biochemical characterization of indigeneous species of the *Ericales* order and to the elucidation of the systematical position of the *Empetraceae* tribe, of the *Oxycoccus*, *Vaccinium* and *Empetrum* genera and of the relationship between the subtribes of the *Ericaceae* tribe.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 1, 83–100 (1973)

REFERAT GENERAL

ORIENTĂRI ŞI TENDINŢE ÎN ENZIMOLOGIA COMPARATĂ*

MIHAIL ŞERBAN

Rezumat. — Se abordează şi se exemplifică principalele orientări şi tendinţe în enzimologia comparată, subliniindu-se ideea existenţei unor modificări evolutive la nivelul diferitelor tipuri de enzime. Se formulează coordonatele fundamentale ale enzimologiei comparate care se circumscriu marilor probleme ale evoluţiei, se descriu unele aspecte referitoare la semnificaţia biologică a enzimelor şi izoenzimelor şi se discută semnificaţia unora dintre proprietăţile generale ale enzimelor, ca parametri de studiu în enzimologia comparată.

CONSIDERAŢII GENERALE

Biochimia comparată reprezintă un domeniu de actualitate şi perspectivă în contextul ştiinţelor biologice. Ea s-a impus cu autoritate atît ca concepţie, cît şi ca metodă de investigaţie, fiind considerată ca una dintre cele mai actuale modalităţi de abordare a biologiei.

Progresele realizate în acest domeniu, mai ales în ultimul deceniu, au contribuit la conturarea pe baze moderne a două direcţii majore de cercetare, şi anume enzimologia comparată şi evoluţia moleculară. De fapt, între aceste două direcţii există multe interferenţe, care, în fond, reflectă tendinţa comună în abordarea şi cercetarea problemelor evoluţiei biochimice a lumii vii. Evoluţia moleculară se bazează, în bună măsură, pe date furnizate de enzimologia comparată, după cum enzimologia comparată tinde să demonstreze şi să consolideze concepţia asupra evoluţiei moleculare. Orientarea cercetărilor de biochimie comparată în aceste două direcţii şi interesul pe care îl polarizează sînt justificate de semnificaţia şi implicaţiile lor în ansamblul ştiinţelor biologice, în general, şi în evoluţia biochimică, în particular; totodată, asemenea preocupări sînt interesate în elucidarea mecanismelor intime de acţiune a enzimelor şi al relaţiilor lor structural-funcţionale, prin studiul acestora la diferite trepte evolutive ale materiei vii. Enzimologia comparată se conturează, aşadar, ca una din ariile importante de cercetare în biologia actuală.

Coordonatele fundamentale ale enzimologiei comparate, care se circumscriu marilor probleme ale evoluţiei, pot fi formulate astfel:

— stabilirea şi caracterizarea trăsăturilor comune şi distinctive la nivelul structurii şi proprietăţilor moleculare ale enzimelor omoloage, provenind din surse filetice diferite;

— identificarea şi caracterizarea situsurilor catalitic active ale enzime-

---

* Prezentat la Simpozionul de biocataliză, Bucureşti 9-10 iunie 1972.

lor omoloage de diverse origini, ca și precizarea gradului de modificări conformaționale posibile în prezența substratelor sau inhibitorilor;

— evidențierea și determinarea prin studii comparative, la diferite nivele filetice, a structurilor minime pe care enzimele omoloage le-au reținut nealterate în cursul evoluției pentru exercitarea unei funcții catalitice specifice; implicit, se deduce necesitatea stabilirii semnificației variațiilor structurale observate și, respectiv, a importanței decisive a unor detalii structurale în fixarea substratelor;

— studiul corelației dintre codificarea genetică și evoluția enzimelor omoloage, ca molecule fenotipice, și stabilirea localizării mutațiilor produse în cursul evoluției, cu precizarea gradului de variații permisibile și letale;

— stabilirea filiației speciilor pe baze biochimice, crearea unei filogenii moleculare și înțelegerea mecanismelor de evoluție a căilor metabolice.

Datele prezentate în acest referat încearcă să ilustreze unele din aceste coordonate și să contureze, pe cît posibil, cîteva din semnificațiile lor.

ASPECTE ALE EVOLUȚIEI ENZIMELOR ȘI SEMNIFICAȚII BIOLOGICE

Ipoteza persistenței activităților multienzimatice de-a lungul unor linii în general similare [10] a fost confirmată și a devenit baza cercetărilor moderne de enzimologie comparată, deschizînd barierele cunoașterii noastre pentru fundamentarea mecanismelor de evoluție a enzimelor. Aceasta sugerează, totodată, că încă de timpuriu, în primele faze ale evoluției, s-a produs, relativ rapid, o mare diversitate a tipurilor primitive de enzime.

Din punctul de vedere al biochimiei comparate, în general, și al enzimologiei comparate, în special, datele recente indică faptul că printre organismele contemporane evoluția enzimelor reflectă schimbări minime dacă le raportăm la schimbările dramatice care sînt de presupus a se fi petrecut anterior zămislirii celor mai primitive forme de viață. Conform concepțiilor noastre actuale, evoluția enzimelor se corelează cu variațiile, mai mult sau mai puțin profunde, petrecute la nivelul genomului și, respectiv, al DNA-ului, ca bază moleculară a acestei evoluții [22]. Cu alte cuvinte, evenimente evolutive la nivel molecular pot fi derivate de la rolul materialului genetic în definirea structurii și proprietăților produșilor specifici ai genei, iar selecția poate fi bazată pe potrivirea biologică a acestor produși în diferite sisteme biologice. Clase mari de enzime s-au putut dezvolta, cu suficientă probabilitate, din gene unice ancestrale, printr-un proces de duplicare și evoluție divergentă ulterioară [10]. Se poate deduce implicit, că marea varietate de enzime inventariate în organismele actuale reprezintă produsul unui număr relativ mic de gene (poate chiar înrudite structural) care, în etapele inițiale ale istoriei materiei vii, determinaseră un minim de enzime pentru catalizarea unor tipuri de reacții fundamentale.

Deși există mai multe căi posibile de evoluție a enzimelor [2], [32], [38], trebuie totuși remarcată trăsătura definitorie pe care cercetările recente de enzimologie comparată au fundamentat-o experimental, și anume că evoluția enzimelor a fost, în general, de tip conservativ. Această aserțiune este argumentată datorită restricțiilor impuse de existența

unor tipuri invariabile de cofactori, care prin lipsa oricărei evoluţii au limitat, evident, modificări profunde în molecula enzimelor [10]. În acest sens, s-a remarcat faptul că modificarea coenzimelor este extrem de limitată, acestea fiind insensibile la eventuale schimbări evolutive, deoarece un mare număr de enzime reclamă acelaşi cofactor.

După cum este cunoscut, utilizarea în enzimologia comparată a analogilor coenzimatici (tip NAD) a permis stabilirea unor diferenţe de comportare la o serie de enzime, în funcţie de specificitatea de specie, de organ sau de substrat [7], [43]. S-a demonstrat că anumite dehidrogenaze NAD-dependente pot utiliza analogi coenzimatici, prezentînd curbe de saturare şi de inhibiţie cu substrat diferit de cele obţinute cu coenzimele naturale. Astfel, vitezele de reacţie cu analogul 3-acetil piridină indică o gradaţie de la valori de ordinul sutelor în cazul alcool dehidrogenazei, malat dehidrogenazei şi glutamat dehidrogenazei la valori de ordinul zecilor sau unităţilor în cazul lactat dehidrogenazei (LDH) şi gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazei, pentru ca β-hidroxibutirat dehidrogenaza sau α-glicerofosfat dehidrogenaza să nu reacţioneze în prezenţa analogului coenzimatic. Ar rezulta, deci, că structura moleculară a enzimelor care catalizează acelaşi tip de reacţie şi sînt dependente de acelaşi tip de coenzimă poate prezenta modificări discrete la diverse specii, modificări ce se pot repercuta asupra situsurilor catalitice şi sînt exprimate prin vitezele de reacţie cu acelaşi analog coenzimatic. Evoluţia enzimelor, în speţă a dehidrogenazelor, s-ar fi produs numai în măsura în care o formă mutantă a putut încă să reacţioneze cu cofactorul ei natural.

Un caz aparte îl reprezintă problema evoluţiei enzimelor care nu reacţionează prin intermediul coenzimelor sau nu posedă grupări prostetice. Subtilizinele, de pildă, manifestă o omologie evidentă în raport cu proteazele animale; cu toate acestea, este încă dificil de precizat dacă enzimele proteolitice ar avea o aceeaşi origine moleculară ancestrală. Proteazele se caracterizează, în general, printr-o specificitate largă, diversă şi prezintă diferenţe în secvenţele lor de aminoacizi; o considerabilă variaţie în structura primară o manifestă, de asemenea, subtilizinele.

Pe baza generalizării cercetărilor recente s-a conturat ideea că, spre deosebire de enzimele care au necesităţi definite, stricte de substrat şi care utilizează cofactori determinanţi pentru activitatea lor, la enzimele cu specificitate largă şi care nu reclamă cofactori pentru activitatea lor, modificările evolutive s-au petrecut cu viteze mult mai rapide decît în cazul primelor [10].

Unul dintre aspectele majore ale enzimologiei comparate, spre care se concentrează preocupările actuale, se referă la semnificaţia biologică a evoluţiei enzimei. Acest aspect implică, în mod logic, măsura în care modificările mai mult sau mai puţin profunde ale unei enzime constituie un avantaj funcţional, cu implicaţii biologice adecvate pentru un organism dat. Se acreditează ideea că schimbările evolutive la nivelul enzimelor urmează legile selecţiei naturale [3], [16], [28]. Situsul catalitic este considerat a fi regiunea moleculei de enzimă care ar fi sub cea mai mare presiune a selecţiei, orice mutaţie produsă la acest nivel implicînd afectarea activităţii enzimatice. Se postulează că regiunea peptidică corespunzătoare situsului catalitic este una din cele mai primitive ale enzimelor, fiind stabilizată prin selecţie naturală.

Existenţa şi particularităţile formelor moleculare multiple ale enzimelor constituie un exemplu de evoluţie şi adaptare [6], [10], [14], [15], [20]. Astfel, este binecunoscută funcţia metabolică distinctă a celor două tipuri parentale de izoenzime LDH — tip M şi tip H — precum şi condiţiile fiziologice în care lucrează aceste tipuri [15], [19]. Izoenzima tip H operează în celule cu profil metabolic aerob, nu permite acumularea de lactat şi orientează oxidarea completă a piruvatului via ciclul Krebs; izoenzima tip M operează în celule cu profil metabolic anaerob şi la praguri ridicate de piruvat, permiţînd conversia rapidă a piruvatului la lactat, cu stabilirea unei datorii de oxigen în condiţii anaerobe; tipul M este deci mai adecvat pentru oxidarea NADH într-un sistem cu glicoliză rapidă [14], [15].

Semnificaţia funcţională distinctă a celor două forme parentale H şi M denotă că acestea au evoluat, adaptîndu-se unor necesităţi metabolice. Date recente au dovedit că gradul diferit de inhibiţie prin substrat (piruvat) al celor două izoenzime s-ar datori formării unui complex ternar între piruvat, coenzima oxidată şi cantităţi stoichiometrice de enzimă [11]. Pentru formarea acestui complex (fig. 1) cu izoenzima M sînt nece-

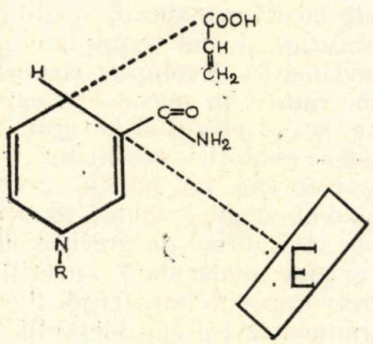


Fig. 1. — Formula complexului ternar după Kaplan şi colab. [11].

sare concentraţii mai mari de piruvat decît în cazul izoenzimei H, care este blocată prin exces de substrat; de asemenea, constanta de disociere a complexului cu izoenzima H este mai mică decît a complexului cu izoenzima M. Mecanismul posibil al inhibiţiei de substrat ar fi următorul:

$$\text{NADH} + \text{piruvat} \xrightarrow{\text{LDH}} \text{lactat} + \text{NAD}^+$$

$$\uparrow \quad \text{competiţie}$$

$$[\text{NAD}^+ + \text{piruvat} + \text{LDH}] \rightarrow \text{complex ternar.}$$

Viteza de reacţie cu concentraţii mari de piruvat este mult diminuată în prezenţa tipului H, în comparaţie cu tipul M. Izoenzima M, predominantă în muşchii striaţi voluntari, prezintă un avantaj selectiv, favorizînd glicoliza, fără posibilitatea inhibiţiei sale de către piruvat. De aceea, se acreditează opinia că enzima tip M funcţionează ca o piruvat-reductază, mai degrabă decît ca o dehidrogenază, spre deosebire de enzima H care formează complexul ternar la concentraţii mici de piruvat şi ar micşora viteza glicolizei prin prevenirea oxidării NADH generat.

Tot ca un fenomen de adaptare metabolică poate fi citat şi faptul că păsările capabile de perioade de zbor lungi şi susţinute conţin în muşchiul pectoral o proporţie mult mai mare de subunităţi H, care previn acumularea lactatului; dimpotrivă, muşchiul pectoral al păsărilor care pot executa numai zboruri scurte conţine într-o proporţie mai mare tipul M, ceea ce permite formarea de lactat şi contractarea unei datorii de oxigen însoţită, evident, de oboseală [42]. În general, la muşchii care se contractă ritmic sau tonic, predomină izoenzima H, iar la cei care se contractă rapid şi numai la anumite intervale predomină izoenzima M. Relaţia dintre modelul izoenzimatic şi rolul metabolic a fost demonstrată şi la amfibii; s-a constatat astfel o corelaţie între disponibilitatea de oxigen din mediul extern şi inhibiţia prin substrat a tipului H, inhibiţie care este mai mare la amfibiile terestre decît la cele acvatice, ultimele prosperînd într-un mediu mai puţin oxigenat [26].

Deplasarea activităţii enzimatice în spectrul electroforetic al izoenzimelor LDH din creier în filogenie [31], de pe tipurile cu migrare lentă pe cele cu migrare rapidă, constituie o caracteristică ce denotă nu numai schimbări evolutive şi adaptări ale sistemului proteic-enzimatic, dar şi modificări ale proceselor metabolice (fig. 2). Acest fenomen se corelează cu particularităţile funcţionale ale creierului, ca expresie a însăşi

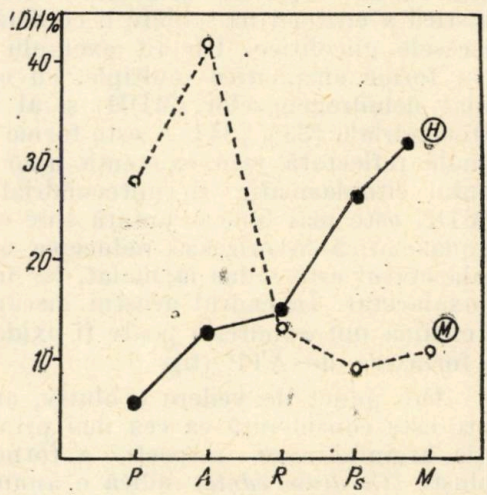


Fig. 2. — Deplasarea activităţii enzimatice în spectrul electroforetic al izoenzimelor lactat dehidrogenezei (tipul H şi M) din creier, în evoluţia filogenetică după Şerban [31].

P — peşti; A — amfibii; R — reptile; Ps — păsări; M — mamifere.

evoluţiei sale pe plan filogenetic. S-a sugerat posibilitatea unei tranziţii de la procese de tip aerob, mai puţin accentuate în creierul speciilor situate pe primele trepte de evoluţie a vertebratelor, spre procese de tip preponderent aerob, specifice creierului vertebratelor mai evoluate, respectiv ale mamiferelor.

Tipul de aldolază musculară este profilat cu precădere pentru scindarea fructozo-1,6-difosfatului, deci spre glicoliză; enzima de tip hepatic este profilată însă pentru gluconeogeneză, acţionînd în sensul formării fructozo-difosfatului [24], [25]. Este de menţionat, totodată, că aldolaza hepatică acţionează, în sensul clivării fructozo-1-fosfatului, cu mai mare eficienţă decît enzima musculară, ceea ce denotă că ficatul posedă capacitatea de a converti fructoza la glucoză. Hexokinaza implică un sistem

de patru tipuri de izoenzime, prezente în diferite organe, la numeroase specii [27]; ele se deosebesc printr-o serie de parametri fizici și cinetici. Existența izohexokinazelor cu distribuție caracteristică de țesut în multe specii animale presupune un anumit rol fiziologic pe care ele îl exercită. Se cunoaște astfel, în special, rolul tipului IV de izoenzimă — glucokinaza hepatică — care prin proprietățile ei cinetice concordă cu cerințele metabolice ale ficatului pentru fosforilarea glucozei, precum și cu permeabilitatea crescută pentru glucoză. Lipsa de inhibiție a acestei glucokinaze prin glucozo-6-fosfat permite ca glucoza să fie fosforilată continuu, chiar la concentrații la care glucozo-6-fosfatul exercită o acțiune inhibitoare asupra altor izohexokinaze. Se postulează să controlul activității hexokinazei ar fi diferit, în funcție de tipul predominant de hexokinază. Izoenzima tip I predomină în organe cu activitate metabolică relativ constantă (creier, rinichi), pe cînd izoenzima tip II pare a fi caracteristică pentru țesuturi a căror activitate metabolică poate varia mult (mușchiul scheletic); în fine, izohexokinaza tip III este caracteristică țesuturilor în care insulina stimulează consumul glucozei.

Un exemplu de semnificație biologică îl constituie și tipul de gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenază hepatică, care, comparativ cu enzima similară din mușchi, manifestă o capacitate mai mare de reducere a acidului 1,3-difosfogliceric la aldehida corespunzătoare [19]; această caracteristică a enzimei musculare îi conferă astfel posibilitatea de a favoriza procesele glicolitice. Un alt exemplu ilustrativ îl constituie existența unor forme enzimatice multiple, cu origine biloculară, cum este cazul malat dehidrogenazelor (MDH) și al transaminazelor citoplasmatice și mitocondriale [33], [34]. Aceste forme enzimatice indică o variație funcțională reflectată prin existența unor proprietăți catalitice diferite ale tipului citoplasmatic și mitocondrial. De pildă, forma mitocondrială a MDH este mai bine orientată spre oxidarea malatului, pe cînd forma citoplasmatică favorizează reducerea oxalacetatului [9]. În citoplasmă, oxalacetatul este redus la malat, iar în mitocondrii malatul este oxidat la oxalacetat. În cadrul acestui mecanism („suveică"), $NADH_2$ produs de enzima mitocondrială poate fi oxidat prin lanțul respirator și cuplat cu formarea de ATP (fig. 3).

Din punct de vedere evolutiv, argininkinaza prezentă la nevertebrate este considerată ca cea mai primitivă fosfagenkinază [40]. Distribuția argininkinazei respectiv a formei monomere și dimere la unele moluște (*Cardium edule*) indică o anumită corelație cu tipul de mușchi, respectiv cu specializarea funcției musculare. Aductorii care efectuează atît o contracție tonică, cît și mișcări rapide au ambele izoenzime (monomer și dimer) în cantități egale; izoenzima de tip monomer predomină în mușchiul sifonului, care are o funcție eminamente tonică, în comparație cu mușchiul piciorului care este foarte activ și în care predomină forma dimeră a enzimei. Se consideră că enzima monomer este mai primitivă din punct de vedere evolutiv, fiind asociată cu tipul de mușchi neted, primitiv; enzima dimer este mai evoluată, fiind asociată cu tipul de mușchi activ, care, la rîndul său, este mai evoluat. Presiunea selecției a determinat evoluția argininkinazei nevertebratelor la creatinkinaza vertebratelor, punctul critic părînd a fi echinodermata, unde unele specii posedă numai argininkinaza, altele numai creatinkinaza, iar altele ambele kinaze.

Fosfagenkinazele studiate la nevertebrate (anelide) s-au dovedit a fi enzime omoloage atît din punct de vedere funcţional, cît şi genetic [37]. Variaţiile în specificitatea lor, precum şi în unele proprietăţi mole-

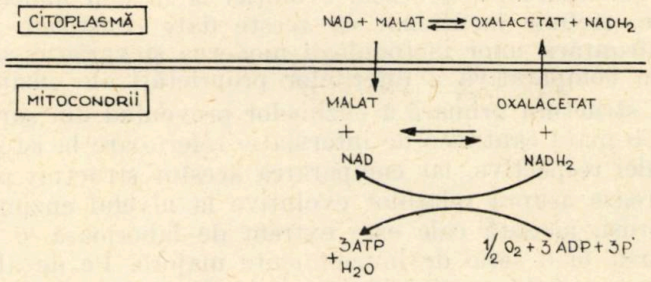


Fig. 3. — Funcţiile metabolice ale malat dehidrogenazei citoplasmatice şi mitocondriale după Kaplan [9].

culare, constituie dovezi ale evoluţiei biochimice. Existenţa unui număr de 7 tipuri de fosfageni cu structuri diverse, dar cu aceeaşi activitate fiziologică a impus în cursul evoluţiei menţinerea unei anumite structuri minime, care a permis fosfagenkinazelor respective exercitarea funcţiei lor catalitice, cu toate că existau variaţii datorite specificităţii substratelor.

Problema adaptării biologice la diferite condiţii de mediu se corelează cu modificări evolutive la nivelul diferitelor enzime. Se poate cita astfel cazul LDH din homari sau peşti care vieţuiesc în ape reci, la care enzima s-a adaptat să opereze cu eficienţă la temperaturi scăzute [40]; LDH de la unii peşti plaţi prezintă o activitate optimă pentru temperatura de +10°C, comparativ cu enzima respectivă de la mamifere şi păsări al cărei optim de activitate este la +37°C. În acelaşi sens poate fi menţionat şi cazul MDH din bacteriile termofile [17], [18]. Astfel, deşi MDH din *Bacillus steareothermophilus* este constituită din patru subunităţi, ca şi MDH din *B. subtilis* sau *E. coli*, totuşi ea manifestă o mare rezistenţă la temperaturi ridicate, maximul de activitate al MDH din *B. steareothermophilus* fiind la +65°C, spre deosebire de MDH din celelalte două microorganisme. Este de presupus că enzimele din organismele termofile posedă structuri primare care le conferă o anumită stabilitate termică, şi deci o anumită funcţie adaptată temperaturilor înalte.

Trăsătura pe care o conturează aceste cîteva exemple referitoare la semnificaţia biologică a evoluţiei enzimelor este aceea că în decursul istoriei evolutive diferitele enzime au putut dobîndi anumite caracteristici funcţionale adaptative, în contextul conservării funcţiei lor catalitice esenţiale, legată de specificitatea enzimatică; totodată, cercetarea comparativă a unei enzime date, provenind din surse filetice diferite, creează posibilitatea definirii acestor caracteristici în raport cu evoluţia şi ca reflectare a unor procese de adaptare.

PROPRIETĂŢI GENERALE ALE ENZIMELOR CA PARAMETRI DE STUDIU ÎN ENZIMOLOGIA COMPARATĂ

Analizînd diferitele date recente prin care enzimologia comparată urmăreşte să fundamenteze procesul evoluţiei la nivelul moleculelor enzimatic active, trebuie menţionat că aceste date constituie rezultanta aplicării şi confruntării unor metodologii moderne şi variate, care au permis explorarea comparativă a diferitelor proprietăţi ale enzimelor.

Desigur, structura primară a enzimelor provenind din surse variate poate include o mare cantitate de informaţie referitoare la istoria evolutivă a moleculei respective, iar compararea acestor structuri poate oferi indicaţii valoroase asupra relaţiilor evolutive la nivelul enzimelor omoloage [3]. Totuşi, această cale este extrem de laborioasă şi întîmpină încă în aplicarea ei o serie de impedimente majore. Pe de altă parte, pornind de la substratul investigaţiilor în enzimologia comparată, o enzimă se caracterizează printr-o serie de proprietăţi care derivă din structura primară şi, implicit, din aranjamentul spaţial, cu implicaţiile ce decurg din organizarea de ordin superior a moleculei respective. Cercetarea comparativă a acestor proprietăţi [2] prezintă o deosebită utilitate în enzimologia comparată [10], [45]. O problemă majoră, care se conturează în perspectiva cercetărilor de enzimologie comparată, o constituie tocmai corelarea studiilor comparative asupra secvenţelor cu diferenţele în proprietăţile catalitice ale unei enzime, proprietăţi care pot prezenta deosebiri în cursul evoluţiei.

Deşi există mai multe căi de abordare a evoluţiei enzimelor, în ultimii ani s-a demonstrat şi validat eficienţa tehnicii catalitice [7], [10], [43] pentru discriminarea comportării unor enzime cu aceeaşi funcţie. Această tehnică a permis, totodată, să se aducă o serie de noi contribuţii în problema eterogenităţii moleculare a enzimelor, respectiv a evoluţiei lor. O serie de cercetări recente s-au axat pe caracterizarea şi stabilirea asemănărilor şi deosebirilor în parametrii catalitici ai enzimelor, cu scopul surprinderii şi definirii unor schimbări evolutive survenite la nivelul lor. Datele obţinute evidenţiază anumite modificări catalitice subtile, petrecute în cursul evoluţiei unei aceleiaşi enzime provenind din diferite organisme.

Determinarea raportului vitezelor de reacţie în prezenţa analogilor coenzimatici şi a coenzimei naturale a permis să se precizeze că LDH omoloage de la vertebratele inferioare prezintă diferenţe în comportarea lor catalitică, în comparaţie cu enzimele formelor superioare. Reactivitatea cea mai înaltă a tipului M (LDH) cu analogul 3-acetil piridină o prezintă păsările, iar cea mai scăzută mamiferele şi, oarecum, amfibiile. Enzima provenită de la specii de reptile are proprietăţi intermediare, între cele ale păsărilor şi mamiferelor. Aceste date, ca şi cele obţinute pe alte căi, concordă cu faptul că reptilele sînt strîns înrudite cu păsările. La peştii plaţi, a căror origine este încă nerezolvată, tipul H (LDH) utilizează, spre deosebire de mamifere, mult mai bine analogul coenzimatic acetil piridină decît analogul tionicotinamidă, raporturile vitezelor de reacţie fiind, de asemenea, mai mari în cazul acestor peşti decît cele consemnate la enzimele ce provin de la vertebrate superioare [8]. Asemenea

caracteristici pot reflecta eterogenitatea moleculară a enzimelor care deservesc aceeaşi funcţie la diferite specii, precum şi deosebiri între enzimele care deservesc o aceeaşi funcţie în cadrul diverselor specii [20]. S-a mai pus în evidenţă faptul că la unii peşti (păstrăv, scrumbie, hering, rechin) LDH din muşchiul roşu manifestă o comportare apropiată, practic similară cu cea din inimă, însă total diferită de a enzimei din muşchiul alb. În cazul altor specii, ca salamandra sau unele păsări, există, dimpotrivă, relaţii strînse între enzimele din muşchiul roşu şi cele din cel alb, enzime deosebite însă de cea din inimă. Desigur, asemenea date ridică problema stabilirii originii comune a unor enzime omoloage, care activează în ţesuturi cu profil metabolic diferit.

Deosebiri marcante se consemnează între nevertebrate şi vertebrate, primele manifestînd o mare diversificare a interspeciilor. S-a dovedit, de pildă, că la praguri scăzute de lactat, LDH din inima de crustacei (homar) prezintă o reactivitate extrem de mică sau chiar nulă cu coeziunea naturală (NAD), pe cînd în prezenţa analogului 3-acetil piridină enzima indică o afinitate extrem de crescută pentru substrat [7], [8]. Reversul acestui fenomen îl prezintă enzima respectivă din inima de mamifer (bou) cu un turnover total diferit decît la homar. Proprietăţi similare manifestă şi alţi crustacei (raci, crabi). La *Limulus*, deşi crab, se constată însă anumite deosebiri în comportarea LDH în raport cu alţi crustacei, *Limulus* fiind dealtfel înrudit cu arachnidele. În acest caz, afinitatea enzimei pentru substrat în prezenţa diferiţilor analogi coenzimatici (acetil piridină) este puternic diminuată sau chiar anulată (piridin-3-aldehidă, tionicotinamidă), în comparaţie cu utilizarea coenzimei naturale de către aceeaşi enzimă. O serie de alte caracteristici catalitice indică, de asemenea, că enzimele celor două nevertebrate — homar şi *Limulus* — sînt diferite. Aceasta s-a confirmat şi pe cale imunochimică, LDH de la homar dînd reacţie încrucişată numai cu enzima de la crab, însă nu şi cu cea de la *Limulus*. Proprietăţi catalitice similare enzimei de la *Limulus* manifestă şi LDH extrasă de la scorpioni şi păianjeni, specii care fac parte din acelaşi subfilum ca şi *Limulus*. La alte nevertebrate, ca moluşte, lipitori, creveţi, LDH se disting prin proprietăţi diferite între ele, precum şi de cele ale altor organisme.

Toate aceste date permit conturarea concluziei că proprietăţile catalitice ale LDH şi, posibil, ale altor enzime au fost supuse unor schimbări subtile în procesul evoluţiei.

Stabilitatea termică, respectiv viteza de inactivare a enzimelor omoloage, s-a dovedit a fi un criteriu fizic valabil pentru stabilirea anumitor corelaţii între organisme aparţinînd diferitelor clase de vertebrate. S-a constatat, ca o trăsătură generală, că la specii strîns înrudite tipul H al LDH prezintă stabilităţi asemănătoare la temperaturi mici, pe cînd la temperaturi mai ridicate apar diferenţe semnificative în vitezele de inactivare termică [40]. Astfel, speciile de păsări (atît *Neognate*, cît şi *Paleognate*), ca şi reptilele superioare, se caracterizează prin temperaturi de inactivare a tipului H (LDH) mai ridicate (+74°C)—(+80°C) şi net deosebite de ale tuturor celorlalte clase de vertebrate, care manifestă o stabilitate termică mai scăzută. Faptul acesta este în concordanţă cu evoluţia păsărilor de la reptile superioare. Este de menţionat, totodată, că în acest punct al evoluţiei vertebratelor s-a produs o creştere evidentă în

stabilitatea termică a enzimei. Același tip de izoenzimă, provenind de la reptile inferioare, ca și de la unele specii de amfibii și pești, indică cele mai scăzute stabilități termice (aproximativ +60°C). Trecerea de la reptile inferioare (*Anapsida*) (aproximativ +58°C) la reptile superioare (*Diapsida*) (aproximativ 80°C) este marcată de o creștere evidentă în stabilirea termică a enzimei [44]. În cazul mamiferelor se consemnează valori cuprinse între +60° și +69°C și se pare că ele au reținut tipul de enzimă H, a cărei stabilitate termică corespunde aceleia a vertebratelor inferioare. Acest fapt este în concordanță cu datele paleontologice și anatomice, conform cărora linia evolutivă care a condus la mamifere pornește de la reptilele anapside.

De asemenea, mobilitatea electroforetică a tipului H (LDH) reflectă anumite caracteristici ale enzimei, care se corelează cu poziția taxonomică a diferitelor specii de vertebrate [44]. În acest sens, mamiferele prezintă o caracteristică distinctivă, comparativ cu celelalte clase de vertebrate, avînd cele mai mari mobilități, iar păsările (în special *Neognatele*) valorile cele mai scăzute. Poziții intermediare ocupă, în ordinea descreșterii acestei mobilități, amfibiile, peștii osoși, reptilele, unii pești cartilaginoși și ciclostomii.

Datele menționate permit unele considerații sub aspect evolutiv. Evoluția biologică divergentă care s-a produs de la nivelul reptilelor se reflectă și în valorile mobilităților electroforetice ale izoenzimei H, care indică în cazul mamiferelor o considerabilă creștere în raport cu reptilele, iar în cazul păsărilor *Neognathe* o diminuare semnificativă. La păsările *Paleognathe* (*Tinamiformes*), *Rheiformes*, *Struthioniformes*) enzima manifestă mobilități apropiate de cele ale reptilelor, mai primitive, din care au evoluat. Se poate deci aprecia că reducerea mobilităților electroforetice ale enzimei s-a produs la *Neognathe*, după ce *Paleognathele* au evoluat de la reptile și înainte ca păsările actuale să se fi diversificat [44].

Există, așadar, o bună concordanță între datele de stabilitate termică și cele de mobilitate electroforetică determinate pentru izoenzima H, pe de o parte, și datele paleontologice și anatomice, pe de altă parte, cu privire la liniile de evoluție filogenetică a vertebratelor, după cum rezultă din figura 4.

O altă constantă fizică care este considerată drept criteriu în cercetările comparative referitoare la schimbările evolutive ale unei enzime date este greutatea moleculară. În acest sens este de notat că atît argininkinaza [40], cît și cratinkinaza [23] îndeplinesc același rol biochimic, deși ele diferă substanțial în greutățile lor moleculare, respectiv în modul lor de agregare. Argininkinaza, care operează la nevertebrate, este constituită dintr-o singură subunitate, pe cînd creatinkinaza, care operează la vertebrate, este constituită din două subunități, ambele enzime avînd însă o serie de alte proprietăți similare. Se postulează că cele două enzime ar rezulta dintr-o modificare a unei singure gene și că schimbări discrete la nivelul genei pot determina structuri specifice cu grade diferite de polimerizare. Cele două forme de malat dehidrogenaze — citoplasmatică și mitocondrială — prezintă la majoritatea animalelor, și chiar la plante, o structură dimer predominantă. Spre deosebire însă de acestea din urmă, ca și de numeroase bacterii, la *Bacillus subtilis*, ca și la alți membrii din acest grup, MDH posedă o greutate moleculară dublă,

fiind constituită din patru tetrameri [18]; cu toate acestea, enzima respectivă prezintă unele proprietăţi catalitice asemănătoare cu ale enzimei dimere. Se poate presupune că starea de polimerizare, respectiv de agre-

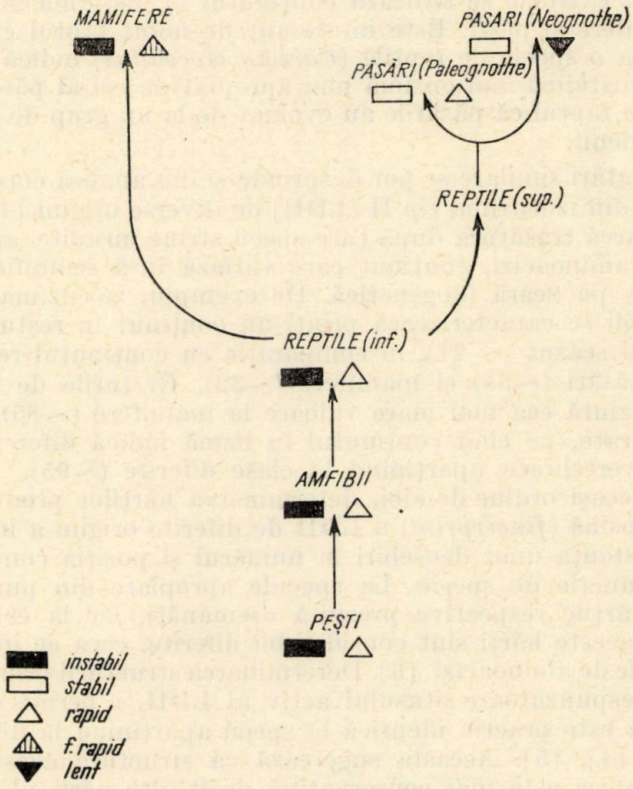


Fig. 4. — Relaţii între stabilirea termică, mobilitatea lactat dehidrogenazei (tipul H) şi arborele evolutiv al vertebratelor după Wilson şi colab. [44].

gare a moleculei depinde de un anumit tip de structură primară, caracteristică unei enzime omoloage la diferite specii. În cazul altor enzime, ca LDH, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, s-a constatat că în cursul evoluţiei nu s-au produs schimbări marcante în greutatea moleculară a subunităţilor constituente, aceasta fiind practic similară la diferite animale [1], ca şi la unele bacterii [17].

Analiza conţinutului în aminoacizi, efectuată la izoenzima de tip M (LDH) provenind de la specii aparţinînd tuturor claselor de vertebrate, a permis stabilirea anumitor însuşiri ale enzimei, în funcţie de treptele de evoluţie, însuşiri care denotă schimbări în structura enzimelor în cursul evoluţiei. Variabilitatea printre diferite specii a altor aminoacizi decît histidina este mai puţin pregnantă [44]. S-a constatat, astfel ,că speciile înrudite sub raport evolutiv au un conţinut în histidină similar, iar diferenţele se accentuează pe măsura distanţei pe scara filogenetică. De

exemplu, pe cînd la păsări — clasă care se caracterizează prin cel mai înalt conţinut de histidină—enzimă purificată indică aproximativ 63 resturi de histidină/mol enzimă, la amfibii acest conţinut reprezintă în medie abia aproximativ 27 resturi de histidină/mol enzimă. Între aceste două extreme se situează conţinutul în histidină al izoenzimei M de la mamifere şi peşti. Este interesant de notat faptul că enzima provenită de la o specie de reptilă (*Caiman crocodilus*) indică un număr de resturi de histidină/mol enzimă mai apropiat de cel al păsărilor, ceea ce concordă cu faptul că păsările au evoluat de la un grup de reptile înrudit cu crocodilienii.

Constatări similare se pot desprinde şi din analiza conţinutului unor aminoacizi din izoenzima tip H (LDH) de diverse origini [44]. Şi în acest caz se remarcă trăsătura după care specii strîns înrudite au un conţinut similar de aminoacizi, conţinut care variază însă semnificativ la specii îndepărtate pe scară filogenetică. De exemplu, izoenzima H provenind de la amfibii se caracterizează printr-un conţinut în resturi de arginină evident mai scăzut (~ 21), în comparaţie cu conţinutul respectiv determinat la păsări (~35) şi mamifere (~32). Resturile de isoleucină/mol enzimă prezintă cea mai mare valoare la mamifere (~85), în raport cu alte vertebrate, pe cînd conţinutul în lizină indică diferenţe mici între specii de vertebrate aparţinînd la clase diferite (~95).

În aceeaşi ordine de idei, determinarea hărţilor produşilor de scindare cu tripsină (*fingerprint*) a LDH de diferite origini a indicat, de asemenea, existenţa unor deosebiri în numărul şi poziţia compuşilor hidrolizaţi, în funcţie de specie. La speciile apropiate din punct de vedere evolutiv, hărţile respective prezintă asemănări, iar la cele îndepărtate filogenetic aceste hărţi sînt considerabil diferite, ceea ce indică deosebiri în secvenţele de aminoacizi [6]. Determinarea structurii primare la peptida izolată, corespunzătoare situsului activ al LDH, a permis să se conchidă că secvenţa este practic identică la specii aparţinînd la diferite clase de vertebrate [4], [5]. Aceasta sugerează că structura acestei peptide la situsul catalitic este mai conservativă decît alte părţi ale moleculei de LDH. Analiza secvenţelor de aminoacizi adiacente restului cisteină, catalitic activ, a dovedit o remarcabilă constanţă la diferite specii. În cursul evoluţiei s-au putut produce, la diverse specii (mai ales la artropode), înlocuiri întîmplătoare de aminoacizi la extremitatea regiunii catalitic active ce conţine cisteina, pe cînd resturile din jurul cisteinei au rămas invariante, orice mutaţie la această poziţie fiind, probabil, letală. Aceste resturi sînt esenţiale pentru activitatea enzimei, determinînd o anumită geometrie a situsului activ, respectiv legarea substratului sau coenzimei prin forţe necovalente.

Deşi secvenţele primare ale LDH de diferite origini nu au fost, în general, conservate în cursul evoluţiei, totuşi secvenţa peptidei la care este integrat situsul activ dovedeşte o mare stabilitate evolutivă, mai ales cînd este comparată cu schimbările petrecute în secvenţele din alte regiuni ale structurii enzimei. O stabilitate evolutivă similară s-a notat şi în cazul regiunilor tiol active ale triozofosfat dehidrogenazelor şi alcool dehidrogenazelor, regiuni care au fost conservate de la drojdie pînă la mamifere [6].

Un alt aspect al cercetărilor recente de enzimologie comparată îl constituie abordarea relaţiilor evolutive între enzime omoloage, prin tehnici imunologice. Asemenea investigaţii se bazează pe ideea că gradul de asemănare imunologică între proteinele diferitelor specii poate constitui o măsură a gradului de înrudire dintre specii. Comparaţiile imunologice [10], [39], [44] ale enzimelor se bazează pe fixarea cantitativă a microcomplementului; această metodă este foarte sensibilă, sesizînd diferenţe fine în structura enzimelor pe care alte metode imunologice convenţionale nu le detectează. Rezultatele obţinute au permis decelarea anumitor deosebiri discrete în comportarea unor enzime, în funcţie de poziţia taxonomică a speciilor investigate, respectiv în funcţie de relaţiile evolutive dintre ele. Astfel, s-a pus în evidenţă existenţa unei bune concordanţe între taxonomia diferitelor specii de păsări aparţinînd la 11 ordine şi cantitatea de antiser (LDH de pui, tipul H) reclamată pentru fixarea microcomplementului (50%). Valorile cele mai scăzute le prezintă *Galiformele*, *Falconiformele* şi *Anseriformele* (1,0—1,7), iar cele mai crescute se întîlnesc la *Paseriforme*, *Cuculiforme* şi *Charadriiforme* (~5,0). S-a constatat, de asemenea, o corelaţie deplină între reactivitatea încrucişată a unor specii aparţinînd la diferite clase de vertebrate ca păsări, reptile, amfibii, peşti, în raport cu unele enzime (LDH tipul H şi tipul M, aldolaza, triozofosfat dehidrogenaza, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza şi glutamat dehidrogenaza), notîndu-se un paralelism cu diferenţele filogenetice între specii. Valorile concentraţilor în antiser reclamate pentru fixarea microcomplementului cresc pe măsură ce speciile cercetate sînt mai îndepărtate pe scară filogenetică.

Diferenţe marcante au fost sesizate între vertebrate şi nevertebrate [6], [44]. LDH din *Schistosoma mansoni* nu reacţionează încrucişat cu enzima din muşchiul de iepure, dar reacţionează în schimb cu LDH din alte specii de *Schistosoma* şi viermi. Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza prezintă proprietăţi imunologice, ca şi catalitice, identice la mamifere, însă total diferite la crustacee.

Asemenea date sugerează că structura imunologică a diferitelor enzime s-a schimbat cu viteze similare în cursul evoluţiei, aceste viteze avînd în general acelaşi ordin de mărime [10], [12]. Această constatare este ilustrată şi prin rezultatele experienţelor efectuate pe enzime la specii de peşti aparţinînd unor ordine diferite din punct de vedere evolutiv. Astfel, fixarea microelementului faţă de triozofosfat dehidrogenaza şi LDH (tipul M) de la un peşte teleostean superior (*Hippoglossus*), în raport cu aceleaşi enzime de la alţi peşti osoşi (*Teleostei*, *Holostei*, *Palaeoniscoidei*, *Dipnoi*), cartilaginoşi şi *Cyclostomi* (*Petromysom marinus*) indică deosebiri nete, în funcţie de înrudirea lor „evolutivă" : speciile mai apropiate evolutiv de *Hippoglossus* prezintă valori ale concentraţiei antiserului mai mici pentru fixarea microcomplementului, iar speciile mai îndepărtate (mai puţin înrudite) valori cu mult mai mari, care indică o anumită gradaţie în raport cu evoluţia.

Aceste date sugerează modificări evolutive în structura imunologică a celor două enzime, petrecute cu viteze asemănătoare în evoluţia peştilor.

O problemă de perspectivă care se conturează în acest context de cercetări este aceea a necesităţii corelării datelor asupra structurii primare,

terţiare şi cuaternare a unei enzime omoloage cu cele asupra situsurilor antigenice, respectiv stabilirea în ce măsură acestea sînt distincte din punct de vedere imunologic; acest caracter distinctiv poate conferi unor astfel de enzime o valoare superioară pentru cercetările de enzimologie comparată, în raport cu cele care prezintă proprietăţi imunologice apropiate.

Un alt exemplu ilustrativ pentru demonstrarea evoluţiei enzimelor îl constituie cercetările efectuate asupra fructozodifosfat aldolazei [24], [25]. Analiza filogenetică a demonstrat că există două clase de aldolaze care se disting printr-o serie de caracteristici moleculare şi proprietăţi catalitice, intra- şi interspecii. Prototipul clasei I aldolaze îl constituie enzima din muşchiul de mamifere, această clasă înglobînd toate enzimele cu proprietăţi similare (vertebrate, nevertebrate, plante, protozoare, alge); prototipul clasei a II-a aldolaze îl reprezintă enzima din drojdie, această clasă cuprinzînd toate enzimele asemănătoare acestui prototip (bacterii, drojdii, fungi, alge verzi-albastre). O poziţie specială ocupă *Euglena gracilis* şi *Chlamydomonas*, care conţin enzima aparţinînd ambelor clase, DNA controlînd sinteza ambelor enzime. Cele două tipuri de aldolaze sînt sub control metabolic separat, proporţia lor variind cu mediul de nutriţie.

Aldolazele aparţinînd celor două clase se deosebesc prin: necesităţi diferite de cofactori, gradul de inhibiţie prin agenţi de chelatare, activarea prin ioni monovalenţi, necesităţi diferite pentru grupările -SH, pH-ul optim, specificitate de substrat (raportul FDP/FMP), K_m, constanta de sedimentare, greutatea moleculară. S-a constatat, de asemenea, că aldolazele din clasa I sînt compuse din 3 sau 4 subunităţi disociabile în mediu acid, activitatea catalitică depinzînd de organizarea acestor subunităţi. Determinările asupra structurii aldolazelor din clasa a II-a sugerează că moleculele respective se compun însă numai din două subunităţi.

Pe baza proprietăţilor moleculare şi catalitice diferite s-a acreditat ideea că situsurile catalitice ale aldolazelor din cele două clase sînt distincte şi necorelate structural, ceea ce a condus, implicit, la presupunerea că genele structurale respective nu sînt corelate evolutiv.

Deşi datele menţionate indică deosebiri evidente între aldolazele aparţinînd celor două clase, totuşi şi în cadrul unei aceleiaşi clase se detectează unele deosebiri printre aldolaze, acestea fiind asemănătoare, dar nu identice. Astfel, la speciile de vertebrate se evidenţiază existenţa a 3 forme moleculare de aldolaze aparţinînd clasei I: aldolaza A de tip muscular, aldolaza B de tip hepatic şi aldolaza C de tip creier. S-a conchis că aceste variante sînt omoloage, avînd structuri moleculare şi proprietăţi în general similare şi capacitatea de a forma molecule hibride, prin interschimbul subunităţilor. Sinteza acestor tipuri de aldolaze este controlată, cel puţin parţial, de regiuni separate ale genomului. Distribuţia tisulară a aldolazelor A, B şi C parentale şi a hibrizilor respectivi indică reglarea independentă a celor 3 gene omoloage.

Sub raport evolutiv, aldolazele din clasa I şi a II-a au origini filogenetice diferite (fig. 5); de aceea, ele se încadrează în conceptul de enzime analoage, catalizînd în general acelaşi tip de reacţii, dar fiind

independente din punct de vedere filogenetic. Aldolazele aparţinînd celor mai diferite organisme integrate în clasa I au însă o origine filogenetică comună [25], ca şi cele din clasa a II-a. Subclasele A, B şi C de aldolaze reprezintă variante omoloage. Aceste trăsături denotă la nivelul fiecărui

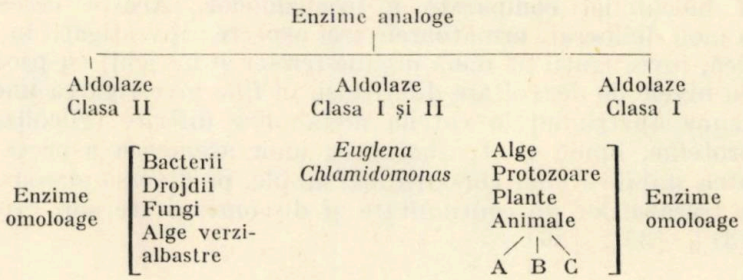


Fig. 5. — Schema variantelor filogenetice ale aldolazelor (după Rutter [24]).

grup existenţa unui proces de conservare a arhitecturii moleculare, precum şi a diferitelor proprietăţi catalitice. După cum s-a menţionat, aldolazele din *Euglena* şi *Chlamydomonas* ocupă o poziţie aparte în contextul relaţiilor filogenetice dintre aldolaze, la nivelul acestor organisme evidenţiindu-se enzime din ambele clase. De aceea, se presupune că în cursul evoluţiei, aldolazele din clasa I au derivat din aldolazele din clasa a II-a, probabil dintr-un progenitor *Euglena* sau *Chlamydomonas* la care se constată prezenţa aldolazelor din clasa a II-a. Sub raport evolutiv, aldolazele din clasa I, spre deosebire de cele aparţinînd clasei a II-a, s-au conservat extinzîndu-se la o varietate largă de organisme. Asemenea presupuneri sînt susţinute de unele modele genetice intuite pentru explicarea originii filogenetice şi a variaţiei proteinelor biologic active.

BIOCHIMIA COMPARATĂ A IZOENZIMELOR

Unul din capitolele de semnificaţie majoră conturat relativ recent în enzimologia comparată îl constituie biochimia comparată a izoenzimelor [14], [15], [41]. Fără îndoială, conceptul de polimorfism enzimatic reprezintă un progres remarcabil în enzimologie cu implicaţii biologice profunde, progres care a permis lărgirea şi adîncirea zonei noastre de cunoaştere asupra structurii şi proprietăţilor enzimelor care servesc aceeaşi funcţie [13], [21], [30]. Fenomenul eterogenităţii enzimatice are o largă răspîndire în lumea vie, ceea ce sugerează contribuţia izoenzimelor la crearea anumitor avantaje metabolice, selectate în cursul evoluţiei.

O mare cantitate de informaţie disponibilă actualmente în domeniul izoenzimelor include aspecte de biochimie comparată şi evoluţie ale acestora. Unele referiri la asemenea date au fost deja făcute în capitolul precedent. Cercetările comparative efectuate într-un ritm extrem de alert în domeniul nou al izoenzimelor au permis stabilirea anumitor caracteristici pe care le prezintă cele mai diverse organisme, în funcţie de poli-

morfismul, proprietăţile cinetice, condiţionarea genetică şi semnificaţia biologică a izoenzimelor. Asemenea aspecte au permis evidenţierea anumitor raporturi privind specificitatea de specie şi cea de organ şi au deschis posibilităţi noi privind explorarea pe baze biochimice a căilor evolutive.

În acest context se înscriu şi cercetările laboratorului nostru în domeniul biochimiei comparate a izoenzimelor. Aceste cercetări au inclus, în mod deliberat, următoarele trei aspecte : investigaţii în evoluţia filogenetică, investigaţii pe două organe (creier şi muşchi) cu profil metabolic şi cu nivele de dezvoltare diferite şi, în fine investigarea unor seturi de izoenzime aparţinînd la catene metabolice diferite (glicoliză, ciclul Krebs, proteine, lipide etc.); abordarea unor asemenea aspecte creează posibilitatea stabilirii unor corelaţii mai ample, pe diverse planuri, cu evidenţierea trăsăturilor de continuitate şi discontinuitate sub raport biochimic [31], [35], [36].

CONCLUZII ŞI PERSPECTIVE

Cercetările actuale de enzimologie comparată, desfăşurate pe multiple planuri experimentale demonstrează eterogenitatea moleculară a enzimelor omoloage la diferite nivele evolutive şi deschid posibilitatea abordării calitative a similarităţii şi diversităţii structurale (sau chiar funcţionale) a enzimelor. Cunoaşterea tot mai aprofundată a semnificaţiei polimorfismului enzimatic, precum şi a proprietăţilor moleculare ale enzimelor, coroborate cu relaţiile filogenetice poate contribui la înţelegerea evoluţiei lumii vii pe baze biochimice. Evoluţia moleculelor biologic active trebuie considerată sub aspectul existenţei unui control celular al activităţii moleculare, ca şi a unui control molecular al activităţii celulare.

Se conturează, totodată, în perspectivă, posibilitatea confruntării datelor biochimice cu caracteristicile morfologice şi fiziologice ale organismelor, cu implicaţii în taxonomie. Se acreditează şi ideea că studiul modificărilor structurale şi cinetice ale enzimelor poate contribui la stabilirea originii lor comune în anumite linii evolutive, a căilor lor de evoluţie şi a mecanismelor de adaptare la necesităţile metabolice ale fiecărui tip de ţesut.

Aceste aspecte se corelează, implicit, cu studierea şi fundamentarea pe baze biochimice a interrelaţiilor dintre specii, prin precizarea gradului în care anumite lanţuri polipeptidice sau părţi ale moleculei de enzime au putut fi conservate sau alterate în cursul evoluţiei speciilor şi, respectiv, în diferenţierea individuală.

Enzimologia comparată va permite explorarea unor noi zone ale cunoaşterii evoluţiei lumii vii, ca reflectare a procesului evolutiv la nivel molecular.

Prezentat la redacţie la
10 iulie 1972

Institutul de biochimie
Bucureşti

DIRECTIONS AND PURPOSES IN COMPARATIVE ENZYMOLOGY

SUMMARY

The main directions and purposes of comparative enzymology are described and illustrated, and the existence of some evolutive changes at the level of different enzyme types emphasized. The fundamental coordinates of comparative enzymology, subordinated to the great problems of evolution are formulated; some aspects concerning the biological significance of enzymes and isoenzymes are described and the significance of some general properties of enzymes, as investigation parameters in comparative enzymology, are discussed.

BIBLIOGRAFIE

1. Allison, W. S., Ann. N. Y. Acad. Sci., **151**, 180 (1968).
2. Dixon G. H. în *Essays in Biochemistry*, Ed. P. N. Campbell, G. N. Greville, Acad. Press, New York, London, 1966, vol. 2, p. 8.
3. Florkin M., *A molecular approach to phylogeny*, Elsevier, Amsterdam, London, New York, 1966, p. 6.
4. Fondy T. P., A. Pesce, I. Freedberg, F. Stolzenbach, N. O. Kaplan, *Biochemistry*, **3**, 522 (1964).
5. Fondy T. P., J. Everse, Federation Proc., **23**, 424 (1964).
6. Fondy T. P., J. Everse, G. Driscoll, F. Castillo, F. Stolzenbach, N. O. Kaplan, J. Biol. Chem., **240**, 4219 (1965).
7. Kaplan N. O., M. Ciotti, M. Hamolsky, R. Biever, Science, **131**, 392 (1960).
8. Kaplan N. O., M. Ciotti, Ann. N. Y. Acad. Sci., **94**, 701 (1961).
9. Kaplan N. O., Bact. Rev., **27**, 155 (1963).
10. Kaplan N. O., în *Homologous Enzymes and Biochemical Evolution*, Ed. N. v. Thoai, J. Rodche, Gordon (and Breach, New York, London, Paris, 1968, p. 105.
11. Kaplan N. O., J. Everse, J. Admiraal, Ann. N. Y., Acad. Sci., **151**, 400 (1968).
12. Kimura M., Nature, **217**, 624 (1968).
13. Koshland E., K. E. Neet, Ann. Rev. Biochem., **37**, 359 (1968).
14. Latner A. L., A. W. Skillen, în *Isoenzymes in Biology and Medicine*, Acad. Press. London, New York, 1968, p. 126.
15. Markert C. L., Ann. N. Y., Acad. Sci., **151**, 14 (1968).
16. Mayr E., Federation Proc., **23**, 1231 (1964).
17. Murphey W. H., G. Kitto, J. Everse, N. O. Kaplan, Biochemistry, **6**, 603 (1967).
18. Murphey W. H., C. Barnaly, F. J. Lin, N. O. Kaplan — J. Biol. Chem., **242**, 1548 (1967).
19. Papadopoulos C. S., S. F. Velik — Federation Proc., **26**, 1682 (1967).
20. Pesce A., T. P. Fondy, F. Stolzenvach, F. Castillo, N. O. Kaplan — J. Biol. Chem., **242**, 2151 (1967).
21. Pollock M. R. — Bull. Soc. Chim. Biol., **49**, 633 (1967).
22. Rich A., în *Horizons in Biochemistry*, Acad. Press, New York, London, 1963, p. 7.
23. Richterich R., U. Wiesmann, B. Cantz, în *Homologous Enzymes and Biochemical Evolution*, Ed. N. v. Thoai, J. Roche, Gordon and Breach, New York, London, Paris, 1968, p. 243.
24. Rutter W. J., Federation Proc., **23**, 1284 (1964).
25. Rutter W. J., T. Rajkumar, E. Penhoet, M. Kochman, Ann. N. Y., Acad. Sci., **151**, 102 (1968).
26. Salthe S. N., Comp. Biochem. Physiol., **16**, 393 (1965).
27. Schimke R. T., L. Grossbard, Ann. N. Y. Acad. Sci., *151*, 332 (1968).
28. Simpson G. G., în *Protides of the Biological Fluids*, Ed. H. Peeters, Elsevier, Amsterdam, London, New York, **12**, 99 (1965).
29. Stambaugh R., D. Post, J. Biol. Chem., **241**, 1462 (1966).

30. STATMAN E. R., Ann. N. Y. Acad. Sci., **151**, 516 (1968).
31. ŞERBAN M., D. COTARIU, Rev. roum. Biochim., **5**, 325 (1968).
32. ŞERBAN M., St. cerc. biol., **21**, 359 (1969).
33. ŞERBAN M., D. COTARIU, Rev. roum. Biochim., **7**, 157 (1970).
34. ŞERBAN M., MARGARETA ŞERBAN, Rev. roum. Biochim., **7**, 231 (1970).
35. ŞERBAN M., Rom. Biochem. Letters, **1**, 87 (1970).
36. ŞERBAN M., D. COTARIU, C. IORDACHE, St. cerc. biochim., **15**, 359 (1972).
37. THOAI, N. v., în *Homologous Enzymes and Biochemical Evolution*, Ed. N. v. Thoai, J. Roche, Gordon and Breach, New York, London, Paris, 1968, p. 199.
38. WALEY, S. G., Comp. Biochem. Physiol., **30**, 1 (1969).
39. WASSERMAN E., L. LEVINE, J. Immunology, **87**, 290 (1961).
40. WATTS D. C., în *Homologous Enzymes and Biochemical Evolution*, Ed. N. v. Thoai, J. Roche, Gordon and Breach, New York, London, Paris, 1968, p. 279.
41. WIEME R. J., în *Homologous Enzymes and Biochemical Evolution*, Ed. N. v. Thoai, J. Roche, Gordon and Breach, New York, London, Paris, 1968, p. 19.
42. WILSON A. C., R. D. CAHN, N. O. KAPLAN, Nature, **197**, 331 (1963).
43. WILSON A. C., N. O. KAPLAN, în *Taxonomic Biochemistry and* Serology, Ed. C. A. Leone, N. Y. Ronald, 1964, p. 321.
44. WILSON A. C., N. O. KAPLAN, L. LEVINE, A. PESCE, M. REICHLIN, W. S. ALLISON, Federation Proc., **23**, 1258 (1964).
45. WILSON A. C., G. KITTO, N. O. KAPLAN, Science, **157**, 82 (1967).

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 1, 101–113 (1973)

RECENZII

D. AMBROSE, *Gas chromatography* (Cromatografia în fază gazoasă), Butterworths, Londra, 1971, 321 p.

Cartea este împărțită în 16 capitole. Primele 5 se ocupă cu descrierea aparaturii : coloana de cromatografie, materialele folosite ca suport, umplerea coloanei, controlul temperaturii acesteia ; sursa de gaz purtător, injectarea probei ; sistemul detector : catarometrul, dispozitivul bazat pe măsurarea densității gazelor, detectorul cu termocuplu și flacără, detectorul de masă, detectorul cu ionizare. Următoarele 3 capitole tratează probleme teoretice : corelațiile dintre parametrii de retenție (volumele de retenție, timpul de retenție, coeficientul de partiție), teoria plăcii și teoria vitezei, factorii care influențează performanța coloanei.

După această inițiere în aparatura și bazele teoretice ale gaz-cromatografiei, în celelalte capitole sînt abordate problemele practice : alegerea solventului, separări selective de hidrocarburi, hidrocarburi halogenate, compuși cu oxigen și sulf, acizi carboxilici, alcooli, fenoli, steroizi, amine, compuși anorganici. Un aspect important abordat este cel al probelor care necesită un tratament special, fiind prea volatile sau aflîndu-se în concentrații prea mici pentru o determinare directă și necesitînd procedee de concentrare, extracție și tratament chimic (hidrogenare, dehidrogenare, hidrogenoliză). După prezentarea unor variante ale gaz-cromatografiei, ca cea frontală, de deplasare, cu programarea presiunii și temperaturii, se descrie cromatografia gaz-solid, cu achizițiile sale recente.

Cartea își atinge scopul de introducere în cromatografia gazoasă și prin faptul că, pe de o parte, demonstrațiile matematice sînt reduse la minim, iar pe de altă parte se folosește un mare număr de grafice și figuri. În același timp și specialistul găsește suficiente date noi și aspecte practice, autorul fiind un nume în acest domeniu. Sfera de cititori căreia i se adresează cartea este destul de largă : biochimiști, biologi, chimiști din industrie și din laboratoarele de cercetare.

Gheorghe Benga
Catedra de biochimie
I.M.F. Cluj

T.J. BOWEN, *An Introduction to Ultracentrifugation* (Introducere în ultracentrifugare), Wiley-Interscience, London-New York-Sydney-Toronto, 1971, 171 p.

Lucrarea cuprinde 11 capitole. În primele se trec în revistă primele ultracentrifuge (Svedberg, 1920) și se prezintă variantele moderne de ultracentrifuge analitice și preparative, cu o listă a firmelor care le produc. Se insistă asupra sistemelor optice cu care sînt dotate ultra-

centrifugele analitice moderne : sistemul bazat pe absorbţia în ultraviolet, sistemul „Schlieren" sau interferometria Rayleigh.

În continuare se prezintă bazele teoretice ale ultracentrifugării, pornindu-se de la lămurirea unor noţiuni elementare : coeficientul de sedimentare (s), exprimat în unităţi Svedberg (1 S = 10^{-13} sec), coeficientul de difuziune, metodele prin care aceştia se pot determina şi relaţia lor cu masa moleculară. Urmează apoi noţiuni teoretice mai dificile ca : ecuaţia continuităţii (Lamm, 1929), care ocupă un rol central în teoria sedimentării, corelînd efectele coeficienţilor de difuziune şi sedimentare şi efectul vitezei unghiulare cu modificarea concentraţiei în timp.

O atenţie mare se acordă aplicaţiilor ultracentrifugării analitice în biologie, la determinarea greutăţilor moleculare ale proteinelor şi lanţurilor polipeptidice izolate, determinarea conformaţiei moleculare, aprecierea omogenităţii unor fracţiuni macromoleculare, analiza cantitativă a unor amestecuri de macromolecule. Necunoaşterea unor fenomene ca : efectul Johnston-Ogston (scăderea coeficientului de sedimentare cu creşterea concentraţiei proteinei), disocierea polimerilor în monomeri, la diluţii mari (explicată prin teoria lui Gilbert) duce la erori de interpretare ale datelor analitice.

Cartea îşi atinge scopul de iniţiere şi prin faptul că aparatul matematic şi demonstraţiile teoretice sînt folosite în măsura strict necesară, iar exemplele practice din biologie sînt folosite la fiecare capitol. Se dau indicaţii bibliografice asupra unor lucrări mai avansate sau consacrate unor probleme speciale. În acest fel, cartea este necesară tuturor cercetătorilor care folosesc ultracentrifugarea preparativă sau analitică : biologi, medici, biochimişti.

Gheorghe Benga
Catedra de biochimie
I.M.F., Cluj

P.J. BENTLEY, *Endocrines and osmoregulation* (Hormonii şi osmoreglarea), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1971, (300 p., 42 tab., 29 fig.).

Este o lucrare amplă, abordînd într-o manieră comparativă problema reglării apei şi a sărurilor la vertebrate. Lucrarea este împărţită în 7 capitole. Primul, consacrat problemelor osmotice la vertebrate, cuprinde distribuţia geografică şi ecologică a vertebratelor, anatomia lor osmotică, schimburile lor osmotice cu mediul înconjurător, forţele care afectează schimburile de apă şi săruri, structurile biologice care participă la schimbul de fluide, metabolismul azotului şi excreţia şi, în sfîrşit, osmoreglarea şi originea vertebratelor. Capitolul al II-lea tratează problema sistemului endocrin la vertebrate. Sînt trecute în revistă morfologia, secreţia şi funcţiile hipofizei, tiroidei, paratiroidei, insulelor lui Langerhans, gonadelor, suprarenalelor şi ţesuturile endocrine presupuse de la peşti (corpusculii lui Stannius, sistemul neurosecretor caudal şi urofiza). Celelalte 5 capitole sînt consacrate fiecare cîte unei clase de vertebrate. Astfel, în capitolul al III-lea este prezentată osmoreglarea prin pierdere de apă, respectiv de săruri, şi acumularea de apă şi săruri la monotreme, marsupiale şi mamifere placentare. Pierderile de apă şi rolul cloacului şi intestinului în conservarea apei la păsări, precum şi conservarea şi excreţia de săruri sub efectul hormonilor adrenocorticali, reproducerea, migrarea şi osmoreglarea în general şi la unele cazuri speciale (păsări de deşert) sînt descrise în capitolul al IV-lea. În continuare, în capitolul al V-lea este discutată problema schimburilor de apă şi săruri, precum şi acumularea acestora la

reptile. În capitolul al VI-lea, în afara acelorași aspecte, caracteristice însă amfibienilor, mai sînt prezentate și osmoreglarea în cursul metamorfozei, funcțiile țesutului adrenocortical și ale neurohipofizei în legătură cu osmoreglarea, aspecte specifice legate de metabolismul azotului etc. În sfîrșit, în ultimul capitol sînt descrise glandele endocrine la pești, schimburile de apă și săruri, adaptările specifice ale osmoreglării și rolul hormonilor la peștii actuali și la unele forme pe cale de dispariție.

Înțelegerea materialului prezentat este înlesnită de o iconografie adecvată și bine aleasă, iar consultarea lucrării este facilitată de două indexuri; de subiecte și de sistematică. Lucrarea conține de asemenea și o bogată bibliografie. Prezentarea grafică, excelentă, întregește calitățile volumului.

Deși, așa cum arată însuși autorul în prefață, cartea se adresează în special tinerilor cititori, datorită bogăției și actualității datelor prezentate, precum și modului original de abordare a problemelor expuse, ea reprezintă o valoroasă sursă de informare pentru toți cercetătorii din domeniul biologiei.

Dita Colariu
Institutul de biochimie
București

H. SELYE, *Hormones and resistance* (Hormonii și rezistența), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1971, vol. 1—2 (1140 p., 37 fig.).

Personalitate științifică de renume mondial și autor a numeroase cărți, H. Selye prezintă în lucrarea de față un vast material documentar privitor la problema rolului hormonilor în rezistența organismului, alcătuit atît din observații personale, cît și din date de literatură. Materialul lucrării este împărțit în 11 capitole urmate de o privire generală asupra datelor expuse și o extrem de bogată bibliografie.

Lucrarea începe prin stabilirea terminologiei și a clasificării utilizate, conturînd apoi istoricul cercetărilor asupra reglării rezistenței de către hormoni și stadiul actual al acestora. În continuare se face o succintă trecere în revistă a reacțiilor enzimatice care ar putea participa la metabolizarea substratelor ce sînt influențate de hormonii adaptivi urmată de un capitol de farmacologie generală a compușilor care afectează rezistența organismului. Apoi sînt descrise pe larg efectele steroizilor și ale altor hormoni, precum și ale unor factori nehormonali, asupra rezistenței, estimîndu-se și aplicabilitatea clinică a reglării hormonale a rezistenței, cu diversele ei implicații. Un capitol următor este consacrat morfologiei și descrie acele modificări care ar putea fi legate de formarea enzimelor adaptive în țesuturile hepatice și extrahepatice. În sfîrșit, un alt capitol cuprinde o privire generală asupra teoriilor privitoare la rolul hormonilor în menținerea rezistenței, discutîndu-se participarea ficatului în general, a enzimelor hepatice, a RNA și DNA, a lizozomilor, a sistemului reticulo-endotelial, a diferiților stressori etc. Lucrarea se încheie cu un capitol sinoptic al interrelațiilor farmaco-chimice și farmaco-farmacologice și cu o privire generală asupra tuturor datelor prezentate.

Lucrarea este scrisă într-o manieră cu totul originală, așa cum arată însuși autorul, în stil analitic-sintetic. Cu alte cuvinte, analiza datelor de literatură furnizînd faptele experimentale este strict separată de „sinteza" și evaluarea lor subiectivă de către autor.

Amploarea informației din prezenta monografie (sînt prelucrate peste 4 000 de titluri), precum și multilateralitatea aspectelor abordate fac ca ea să prezinte un deosebit interes pentru cercetătorii din diversele ramuri ale biologiei.

Dita Cotariu
Institutul de biochimie
București

THE DYNAMIC STRUCTURE OF CELL MEMBRANES (Structura dinamică a membranelor celulare), ed. D.F. Hölzl Wallach, H. Fischer, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1971, 253 p., 87 fig.

Volumul conține lucrările celui de-al 22-lea Colocviu al Societății de chimie biologică, care a avut loc între 15—17 aprilie 1971 la Mosbach/Baden.

Numeroase lucrări din ultimii ani au dus la convingerea că membrana plasmatică ocupă o poziție centrală în nenumărate aspecte ale biologiei moleculare și medicinii. Pentru a aprofunda înțelegerea proceselor legate de membrane și de receptorii din membrane, colocviul a selecționat o serie de teme mai generale; astfel, s-au discutat aspecte legate de membranologia moleculară, de contactul și comunicarea dintre celule și reacțiile lor cu morfogeneza și diferențierea, de metabolismul fosfolipidelor din membrane în timpul activării și diferențierii celulare, de unele aspecte ale dinamicii antigenelor de pe suprafața celulară, de cooperativitatea în biomembrane (H. Wallach). Printre lucrările referitoare la un anumit tip de celulă se remarcă cele despre modificările glicolipidelor asociate cu transformarea malignă (Hakomori), despre structura și biosinteza membranelor virale (Klenk) și bacteriale (Rothfield).

În vederea studierii relației structură—funcție, Metcalfe a prezentat o lucrare despre determinări de rezonanță magnetică a membranelor, iar Kuhn date despre membrane lipidice și lipoproteice sintetice.

Membranele mitocondriale au fost și ele prezente, într-o lucrare a lui Lehninger, despre sistemul de transport al Ca^{2+}.

În cadrul mesei rotunde organizate la sfîrșitul colocviului au fost discutate probleme legate de autoasamblare, biosinteză, permeabilitate pasivă, recunoaștere celulară în diferențiere, constituția membranelor, teoria receptorilor.

Lucrările prezentate în cadrul colocviului aduc o contribuție însemnată în cunoașterea rolului membranelor celulare.

Gabriela Dinescu
Institutul oncologic
București

Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Band XXVII, Anticoagulantien (Tratat de farmacologie experimentală, Anticoagulante), Edit. F, Markwardt, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberger—New York, 1971, 598 p. 75 fig., 37 tabl.

Materialul monografiei este repartizat în cinci capitole şi face cunoscut stadiul actual al cunoştinţelor despre acei compuşi-medicamente denumite anticoagulante.

Pentru utilizarea judicioasă a acestor compuşi este necesar să se cunoască fiziologia procesului de coagulare a sîngelui; acest subiect este tratat în capitolul I.

În capitolul al II-lea se trec în revistă diferiţi compuşi naturali şi sintetici de origine animală şi vegetală, care produc o inhibare a procesului de coagulare; sînt descrise în mod amplu metode de izolare, determinare, proprietăţi, mecanism de acţiune etc.

Istoricul descoperirii heparinei, chimia acestui compus, proprietăţile fizico-chimice, acţiunea ei de bază şi acţiuni anexe, metode de determinare, posibilităţi de sinteză a heparinei constituie capitolul al III-lea al acestui tratat.

În continuare, în capitolul al IV-lea este descris istoricul descoperirii anticoagulantelor 4-hidroxi-cumarina, bis-hidroxi-cumarina şi 1,3-indandion, metode de determinare, de izolare din materialul biologic, legătura dintre structura chimică şi acţiunea inhibitoare asupra coagulării, ipoteze asupra acţiunii anticoagulantelor şi acţiunea lor în afara sistemului de coagulare.

Capitolul al V-lea, care se extinde pe jumătate din întregul tratat, fuzionează cele mai recente date farmacologice şi chimice ale acţiunii anticoagulantelor.

Tratatul cuprinde o bogată bibliografie la zi (3 943 de indicaţii bibliografice) şi consultarea lui este facilitată de un index de autori şi de subiecte.

Viorica Eleflerescu
Institutul de biochimie
Bucureşti

LIVER CANCER (Cancerul hepatic), IACR Scientific Publications, No. 1, International Agency for Research on Cancer, Lyon 1971, 176 p.

Acest volum cuprinde lucrările unei conferinţe ţinute la Chester Beatty Research Institute din Londra, între 30 iunie—3 iulie 1969. Oncologi de seamă, reprezentînd diferite specialităţi, îşi spun cuvîntul în principalele probleme ale cancerului hepatic.

Volumul cuprinde lucrări privind anatomopatologia cancerului hepatic primar uman (P.J. Scheuer) şi animal (W.H. Butler), precum şi epidemiologia cancerului hepatic uman (M.S.R. Hutt). Alte lucrări abordează legătura dintre diferitele boli ale ficatului şi cancer (J.B. Gibson) şi trec în revistă rolul virusurilor în bolile hepatice cronice, la om şi animal (A.M. Price), precum şi rolul diferiţilor carcinogeni hepatici din mediul înconjurător (P.N. Magee). Se abordează, de asemenea, problema mecanismului cancerizării, avîndu-se în vedere modul de metabolizare a unor agenţi chimici (azoderivaţi, amine aromatice, dialchilnitrosamine) şi reacţia lor cu acizii nucleici şi proteinele celulare (P. Emmelot), dar şi rolul antigenilor hepatici „tranzitivi" (J. Uriel).

O parte destul de mare din volum este consacrată lucrărilor de biochimie a cancerului hepatic. În acest sens se trec în revistă principalele alterări biochimice, în strînsă corelație cu gradul de creștere al hepatoamelor (G. Weber); sînt expuse, de asemenea, testele funcției hepatice și semnificațiile lor în cancerul hepatic primar, dar și în alte boli ale ficatului (I. Bersohn și colab.).

Volumul se încheie cu recomandările pentru viitor ale comisiilor de studii biochimice și metabolice, morfologice, epidemiologice și patologice.

Maria Furnica
Institutul oncologic
București

R.S. NEZLIN, *Stroenie i biosintez antitel* (Structura și biosinteza anticorpilor), Ed. Nauka, Moscova, 1972, 312 p., 31 tabl., 52 fig.

Deși în ultimii ani au apărut numeroase lucrări dedicate celor mai mult investigate domenii ale imunochimiei și imunologiei, în literatura mondială de specialitate lipsea o punere la punct la zi a numeroaselor date acumulate în domeniul structurii și biosintezei anticorpilor, apărute în ultimii trei ani.

Cartea lui R. Nezlin umple un gol resimțit din plin de cei ce lucrează în acest domeniu fiind de fapt o reeditare, revăzută și considerabil lărgită a excelentei sale cărți *Biochimia anticorpilor*, apărută în limba rusă în anul 1966 (vezi St. cerc. biochim. **10**, 181, 1967).

Cartea este împărțită în 7 capitole, bine echilibrate în întindere, intitulate: „Metode cantitative de determinare a anticorpilor", „Izolarea anticorpilor puri", „Proprietățile anticorpilor", Structura anticorpilor", „Biosinteza anticorpilor", „Aspecte genetice ale sintezei anticorpilor" și „Originea diversității anticorpilor".

Scrisă într-o formă extrem de concisă, cartea reușește ca în numai 300 de pagini să cuprindă, fără nici o omisiune, cele mai importante contribuții aduse la cunoașterea mai aprofundată a anticorpilor.

Bibliografia este neașteptat de întinsă pentru o carte de aceste proporții (peste 1 300 de titluri, dintre care aproape 40% apărute în ultimii trei ani!). Cartea poate servi cititorului interesat de structura și metabolismul anticorpilor drept index bibliografic exhaustiv pentru acest domeniu.

Efortul de sinteză este armonios realizat în toate capitolele cărții, fiind încă o dovadă, convingătoare, că cele mai clar scrise și mai ușor de citit cărți rămîn cele realizate de un singur autor. O atenție deosebită se acordă acelor direcții de cercetare în care contribuția personală a autorului este notorie. Astfel, următoarele probleme sînt minuțios descrise: metode de izolare și dozare a anticorpilor, bazate pe utilizarea imunosorbenților, proprietățile optice ale imunoglobulinelor, corelate cu structura lor secundară, arhitectura situsului de combinare a anticorpilor și dinamica biosintezei anticorpilor și a subunităților lor de către celule imunocompetente cultivate *in vitro*.

Cartea *Structura și biosinteza anticorpilor* poate fi citită cu un egal profit atît de cei care lucrează chiar în domeniul prezentat în monografie, cît și de cei care doresc să se introducă în acest domeniu, fie că sînt biochimiști, medici sau biologi.

Victor Gheție
Institutul „Victor Babeș"
București

Pharmacognosy and Phytochemistry (Farmacognozie și fitochimie). Editori: H. Wagner și L. Hörhammer, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1971, 386 p., 164 fig.

Metodele chimice și fizico-chimice utilizate tot mai mult în cercetarea plantelor medicinale au condus la descoperirea unor noi substanțe medicamentoase și la dezvoltarea sintezei de medicamente derivate din cele extrase din plante.

Dezvoltarea și coordonarea acestor cercetări, precum și stabilirea unei mai bune cooperări între diferitele domenii implicate — chimie, biochimie, botanică farmaceutică, medicină — au constituit principalul scop al primului Congres internațional de farmacognozie și fitochimie, care a avut loc la München în 1970, și ale cărui lucrări sînt prezentate în volumul de față.

Atît referatele generale, cît și comunicările originale, bazate pe o bogată bibliografie, includ cele mai moderne și mai diferite aspecte ale cercetării în acest domeniu, ca, de exemplu: analiza, determinarea structurii chimice, sinteza chimică și biosinteza, farmacologia. Sînt astfel prezentate metode de analiză prin cromatografie în gaze și în strat subțire, sinteze de heterocicli din substanțele conținute în valeriana, sinteze de glicoflavonoide, biosinteză de glucozizi iridoizi și secoiridoizi, metabolismul unor compuși prearomatici și aromatici în plante, chemotaxonomia familiei *Compositae*, aspecte chimice și biosinteza alcaloizilor din opiu. De asemenea sînt descrise substanțe antibiotice din plantele superioare, bufadienolide, unele substanțe cocarginogene și unii agenți antitumorali de origine vegetală.

Tabelele, figurile și formulele chimice, prezentate într-o formă grafică deosebită, exemplifică elegant și cu claritate materialul documentar.

Ținînd seama de toate aceste calități, lucrarea constituie o importantă sursă de informație pentru cercetătorii în domeniul substanțelor naturale.

Olguța Macovschi
Facultatea de farmacie

Third international meeting of the International Society for Neurochemistry (A treia întîlnire internațională a Societății internaționale de neurochimie), Budapest 1971, Abstracts, Edit. J. Domonkos, A. Fonyó, I. Huszak, J. Szentágothai, Akadémiai Kiadó, Budapesta.

Volumul cuprinde rezumatele a peste 400 de comunicări prezentate la a treia reuniune internațională de neurochimie. Tematica lucrărilor s-a axat pe cele mai actuale probleme privind proteinele specifice SNC, patologia chimică a bolilor sistemului nervos, mecanismele bio-

chimice ale activității drogurilor asupra SNC, biochimia sinapsei, a mielinei, a lipidelor și glucidelor, a neurotransmițătorilor la nivel sinaptic, influența hormonilor, controlul și reglarea enzimatică în onto- și filogeneză, metode noi de investigare în neurochimie, cu aplicabilitate clinică, de izolare și caracterizare a neuronilor și celulelor gliale, baza biochimică de informare în SN prin codificare moleculară, a activității de integrare, mecanisme de transport, biochimia catecolaminelor etc.

Proteinele specifice SN : au fost studiate structura și proprietățile biologice ale factorului de creștere a nervilor, a proteinelor gliale (S—100) și neuronale (14—3—2) (Shooter, Angeletti, Moore ș.a.), neurofibrilare și neurofilamentare (Shelanski), proteinele diferitelor membrane (Winkler și Hartnagel), glicoproteinele (Brunngraber ș.a.), activitatea de sinteză *in vivo* și *in vitro*, migrarea și transportul proteinelor în condiții fiziologice și patologice (Held și Jung, Edström, Tiplady ș.a.), metabolismul aminoacizilor (Laytha, Sacks, Coxon, Weil-Malherbe, Kometiani, Brante ș.a.). S-au elaborat metode noi de izolare, purificare și caracterizare a proteinelor citoplasmatice și din diferite fracții subcelulare (Herschman, Nagata, Sensenbrenner ș.a.), din culturi de țesuturi (Varon, Lodin ș.a.).

Lucrările de patologie chimică se ocupă de studiul biochimiei bolilor degenerative genetice, a bolilor demielinizante, epilepsiei, bolilor psihice (Tourtelotte, Roboz-Einstein, Huszák, Lowenthal, Bogoch, van Gelder ș.a.).

Compartimentarea în SN: se aduc în discuție proprietățile metabolice ale diferitelor structuri morfologice, caracterizarea compartimentelor metabolice din creier, în special a glutamatului și GABA (Whittaker, Rose, Clarke, Balász, Latzkovits, Kerpel-Fronius ș.a.).

Mecanismul biochimic al activității drogurilor asupra SNC : aspecte biochimice ale mecanismelor colinergice (Hanin), efectul drogurilor psihomimetice anticolinergice (O'Neill), baza moleculară a inhibiției sau stimulării enzimatice de către droguri, corelația dintre nivelul drogurilor din ser și acțiunea anticonvulsivă a unor antiepileptice (Molnar și colab.), relația structură-activitate (Camerman și Camerman), modul de acțiune al drogurilor antidepresive (Ahtee), analgezice la nivel subcelular și molecular (Ghosh, Datta ș.a.).

Simpozionul și comunicările privitoare la mielină cuprind studii asupra metodologiei moderne de separare și caracterizare a mielinei (Folch-Pi, Mehl, Marks ș.a.), enzimelor mielinice, structurii, proprietăților chimice și imunologice ale proteinelor bazice ale mielinei (Eylar), controlul și influențele hormonale asupra mielogenezei, compoziția și modificările patologice ale mielinei, controlul sintezei (Mandel, Kies, Turnbull ș.a.).

Biochimia sinapsei tratează probleme complexe : eliberarea, captarea și sinteza acetilcolinei, activitatea și eterogenitatea acetilcolinesterazei, colinacetiltransferazei, proprietățile veziculelor sinaptice, ale membranelor pre- și postsinaptice, transferul prin membrana sinaptosomală, proprietățile neurotransmițătorilor la nivelul sinapselor, ale terminațiilor nervoase în condiții fiziologice și patologice (Whittaker, Csillik, Guth, Grahame-Smith, Anokhin ș.a.). Comunicările libere s-au referit la enzime și la factorii care afectează activitatea lor (enzime lipolitice, glicolitice, ATP-aze etc.) în dezvoltare și patologie, aspecte neurochimice ale procesului de învățare, biochimia somnului și a stării de veghe, fotoreceptorilor etc. (Palladin, van Korff, Ansell, Pigareva, Sinha, Kreps ș.a.).

Nella Mison-Krigel
Institutul de neurologie și psihiatrie
București

STRUCTURE AND FUNCTION OF CHLOROPLASTS (Structura și funcția cloroplastelor), Editat de Martin Gibbs. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1971, 286 p., 91 fig.

Cloroplastele au fost descoperite cu un secol în urmă dar ele au reintrat în atenția deosebită a cercetătorilor abia în ultimii douăzeci de ani. În afara rolului lor în fotosinteză, cloroplastele oferă și alte direcții de cercetare, foarte actuale în contextul general al studiului organitelor celulare. Scopul cărții de față este de a indica aceste direcții majore, fără intenția de a epuiza subiectele propuse.

Prima secțiune a volumului prezintă un sumar al datelor electronomicroscopice privind ultrastructura plastidelor (proplastide, cloroplaste, cromoplaste). În capitolul destinat mișcării cloroplastelor sînt prezentate, în rezumat, rezultatele cele mai recente și cîteva modele pentru explicarea acestui fenomen. O altă secțiune a cărții tratează problemele eredității și mutațiilor plastidelor. Sînt descrise, astfel, mutații ale plastomului, se precizează natura plastomului și mecanismele de control ale dezvoltării și funcției cloroplastelor. Un spațiu larg este consacrat substratului material al eredității : acizii nucleici, mecanismele de replicare, transcripție, translație a informației în cloroplaste. În sfîrșit, în a treia parte a volumului se prezintă aspecte ale biochimismului cloroplastelor. Se studiază biochimia fotofosforilării, metabolismul carbohidraților și alte procese biosintetice (biosinteza proteinelor, lipidelor, pigmenților cloroplastici etc.).

Fiecare capitol se încheie cu o listă bibliografică, iar volumul are un index de subiecte. Importanța acestei cărți constă în abordarea unor subiecte de largă circulație în momentul de față, ce se înscriu pe linia cercetărilor moderne asupra organitelor celulare.

Constanța Mușolan
Institutul de biochimie
București

CHEMICAL AND BIOLOGICAL ASPECTS OF STEROID CONJUGATION (Aspecte chimice și biologice ale conjugării steroizilor). Editat de Seymour Bernstein și Samuel Solomon. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1970, 529 p.

În bibliografia steroizilor (din care reamintim *Physical properties of steroid conjugates* și *Atlas of steroid spectra*) acest volum este primul care încearcă să prezinte problema conjugării steroizilor dintr-un punct de vedere multiplu : chimic, biologic și clinic. La alcătuirea lui au participat personalități recunoscute din domeniul steroizilor, ceea ce asigură cărții o calitate științifică incontestabilă.

Volumul se deschide cu un capitol de sinteză și caracterizare chimică a steroizilor. Biochimia conjugării acestor compuși este tratată în mai multe secțiuni, privind aspectele enzimologice ale formării și hidrolizei complecșilor. O atenție specială este acordată conjugării estrogenilor, atît din punct de vedere biochimic (formare, metabolism, transport), cît și biologic.

Ultimul capitol al cărții prezintă principalele aspecte clinice ale conjugării steroizilor. Cartea cuprinde o listă de nomenclatură, un indice de autori și unul de subiecte.

Conceput cu scopul de a prezenta critic cunoștințele actuale în domeniul steroizilor, volumul ridică întrebări al căror răspuns va putea duce în viitor la o înțelegere mai profundă a complexității metabolismului steroizilor, a interferenței acestuia cu metabolismul general. Prin aceasta cartea prezintă un deosebit interes pentru cei ce lucrează în domeniul steroizilor.

Constanța Mușolan
Institutul de biochimie

BIOLOGICAL EFFECTS OF POLYNUCLEOTIDES (Efectele biologice ale polinucleotidelor). Editată de R. F. Beers și W. Braun, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1971, 344 p.

În acest volum sînt publicate lucrările unui simpozion de biologie moleculară care a avut loc în iunie 1970, la New York. Originalitatea tematicii sale constă în faptul că polinucleotidele — în speță acizii nucleici — sînt abordate nu doar ca purtătoare și transmițătoare ale unei anumite informații genetice, ci mai ales ca agenți biologici ce intervin în procese de infecție virală, în răspunsul imun, în evoluția tumorilor etc. Sub acest aspect, polinucleotidele prezintă un interes deosebit pentru o eventuală utilizare în medicina umană sau veterinară, ceea ce a dus la dezvoltarea în ultimii ani a unui nou cîmp de cercetare, în care se împletesc probleme de cercetare atît fundamentală, cît și aplicativă. Pe de altă parte, complexitatea unor asemenea probleme a atras cercetători din cele mai variate domenii, ca biologia moleculară, virologia, imunologia, chimia, biofizica, oncologia, farmacologia și medicina clinică.

Lucrările simpozionului s-au orientat, cu precădere, pe două teme majore: inducția interferonului și modificarea răspunsului imun. În capitolul asupra inducției interferonului s-au comunicat lucrări privind relațiile dintre RNA dublu catenar și inducția interferonului, factorii care afectează inducția interferonului de către polinucleotidele sintetice. Alte lucrări au evidențiat specificitatea inducției interferonului, condițiile structurale pe care ribopolimerii trebuie să le îndeplinească pentru a induce interferonul și a avea caracter imunogen. A doua temă majoră, stimularea formării anticorpilor și a imunității mediate de celule, a fost dezvoltată în ucrări asupra spectrului și modului de acțiune al homopolinucleotidelor și al poli-(I : C) și poli-(A : U) în stimularea răspunsului imun. S-a demonstrat rolul lor în sinteza proteinelor, ARN și polizomilor, în creșterea puterii bactericide a macrofagelor etc. Strîns legat de aceste teme, au mai fost comunicate lucrări privind aspectele farmacologice ale acțiunii polinucleotidelor, ale legăturii acestora cu fenomenele din celulele imunocompetente. Volumul conține și cîteva lucrări asupra rolului de matriță ale polinucleotidelor.

Fiecare lucrare comunicată este însoțită de o listă bibliografică și de stenograma discuțiilor purtate pe marginea ei.

Volumul, bogat ilustrat și cu un indice final de subiecte, se recomandă cercetătorilor din variatele domenii ale biologiei și medicinii, ca o carte interesantă prin actualitatea tematicii sale.

Constanța Mușolan
Institutul de biochimie
București

Handbuch der experimentellen Pharmakologie; *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. XXVIII; *Concepts in biochemical Pharmacology*, part. 1 (Manual de farmacologie experimentală, vol. XXVIII, Noțiuni de farmacologie biochimică. Partea 1), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1971, 143 fig., 471 p. Editori: B.B. Brodie, J.R. Gillette, Editor ajutor Helen S. Ackerman.

Capitolele acestui volum sînt grupate în trei secțiuni: „Căile de administrare a medicamentelor", „Centrii de transport și depunere a medicamentelor" și „Centrii de excreție a medicamentelor". Succesiunea acestor secțiuni ilustrează calea parcursă de un medicament, de la pătrunderea lui în organism pînă la eliminare.

Prima secțiune cuprinde 7 capitole, dintre care spicuim: absorbția bucală a medicamentelor (A.H. Beckett, R.D. Hossie), absorbția medicamentelor prin piele (M. Katz, B.J. Poulsen), absorbția medicamentelor din tractul gastrointestinal (L.S. Schanken).

Cea de-a doua secțiune cuprinde 10 capitole, dintre care menționăm: natura interacției medicament-proteină (W. Settle, S. Hegeman, R.M. Featherstone), influența legării de proteinele plasmatice asupra distribuției, activității și eliminării medicamentelor (P. Keen), translocarea medicamentelor la nivelul osului (H. Foreman), translocarea medicamentelor și altor substanțe chimice-exogene la nivelul țesutului adipos (L.C. Mark).

Ultima secțiune a cărții conține 4 capitole, dintre care enumerăm: excreția medicamentelor la nivelul rinichiului (I.M. Weiner), excreția medicamentelor la nivelul bilei (R.L. Smith), excreția medicamentelor prin lapte (F. Rasmussen).

Deosebit de sistematic și riguros prezentate, fiecare din capitolele cărții este însoțit de indicații bibliografice numeroase, cuprinzînd și titlurile articolelor. Ilustrația grafică a cărții este excepțională. Volumul se încheie cu un indice de autori și un indice de subiecte.

Prin tematica abordată, prin prezentarea sa didactică, volumul este necesar întregirii cunoștințelor farmaciștilor și biochimiștilor.

Doina Popov
Institutul de biochimie
București

Residue reviews. Residues of pesticides and other foreign chemicals in foods and feeds (Revistă asupra reziduurilor. Reziduuri de pesticide și de alte substanțe chimice străine în alimente și furaje). Vol. 31, Editor F.A. Gunther, Editor ajutor Jane Davies Gunther, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1970, 155 p.

Colecția de cărți cuprinsă sub denumirea *Residue reviews* are ca obiectiv publicarea unor articole asupra substanțelor pesticide, care persistă ca reziduuri în alimente, în furaje și în produșii de transformare a alimentelor. Probleme legate de influența substanțelor adăugate la alimente (pentru miros, aromă, aspect sau a celor adăugate în timpul preparării, împachetării și depozitării alimentelor) își găsesc de asemeni locul în problematica acestei colecții.

Volumul de față — al 31-lea — cuprinde de fapt, un singur articol: H. M. Hull, „Structura frunzei, legată de absorbția pesticidelor și a altor compuși". Autorul cercetează la nivel ultra-

structural caracteristicile țesutului foliar, în legătură cu posibilitățile de penetrare a pesticidelor aplicate la acest nivel. Titlurile celor 8 capitole ale cărții relevă logica de abordare a relației dintre frunză și pesticidele aplicate (1. Introducere, 2. Cuticulă, 3. Epiderma, 4. Mezofilul și țesutul vascular, 5. Factori proprii plantei ce afectează absorbția 6. Factori de mediu ce afectează absorbția, 7. Proprietățile pesticidelor legate de retenția și pătrunderea lor, 8. Concluzii).

După cum se arată în volum, penetrarea pesticidelor prin cele două căi principale — stomatală și cuticulară — depinde de planta cercetată și de natura pesticidului aplicat. La anumite specii de plante și în etape specifice ale dezvoltării foliare, pesticidele pot pătrunde în frunze prin trichomi (anumiți peri epidermici). În volum se aduc argumente ultrastructurale asupra prezenței porilor foliari, cu rol mai ales în expulzarea cerii epiteliare. Este mai puțin certă funcția porilor foliari ca poartă de pătrundere a pesticidelor în frunze. În penetrarea pesticidelor la nivel foliar se pare că ar juca un rol și ectodesmata (structuri microscopice în formă de tub, găsite în pereții celulelor epidermice). Acestea au importanță în penetrarea pesticidelor, mai ales în regiunile cuticulare care prezintă variații în capacitatea de legare a ionilor și în permeabilitate. Se subliniază rolul deosebit jucat de temperaturile ridicate și de umiditatea atmosferică în pătrunderea pesticidelor la nivel foliar. Lumina și umiditatea solului nu par a avea o influență netă asupra acestui proces. În volumul de față se abordează și problema tipurilor de adjuvanți utilizați în pulverizarea pesticidelor. S-a constatat că agenții activi de suprafață, uleiurile și dimetilsulfoxidul sînt adjuvanți eficienți, permițînd atingerea unor grade echivalente de activitate biologică, cu cantități reduse din agentul intoxicant și reducînd la minim contaminarea mediului.

Articolul deosebit de interesant prezentat în volumul de față se încheie cu un glosar de termeni botanici și cu un rezumat în limbile engleză, franceză și germană. Remarcăm ca deosebit de utile — pentru toți cei interesați în acest domeniu — indicațiile bibliografice complete, cuprinzînd și titlul articolelor extinse pe parcursul a 33 de pagini ale volumului. Cartea este completată de un index de subiecte.

Doina Popov
Institutul de biochimie,
București

H. Fischer, *Handbuch der experimentellen Pharmakologie.* Band 26. *Vergleichende Pharmakologie von Überträgersubstanzen in tiersystematischer Darstellung.* (Manual de farmacologie experimentală. Vol. 26. Prezentarea farmacologică comparativă a substanțelor de transport în sistematica animală). Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1971, 1 074 p., 261 fig.

Hans Fischer realizează pentru prima oară o expunere sistematică și cuprinzătoare a acestei probleme. Deși bibliografia existentă este foarte amplă, practic, exhaustiv prezentată în lucrare, ea nu reușește să acopere decît parțial domeniul imens al farmacologiei comparate în scara animală ; Hans Fischer își propune, și reușește, să facă o prezentare sistematică a tuturor cunoștințelor existente asupra apariției și funcției substanțelor transportoare în regnul animal, de la protozoare pînă la mamifere.

Spațiul cel mai larg este acordat acetilcolinei, despre care, dealtfel, există și cele mai numeroase informații ; sînt examinate, de asemenea, catecolaminele și 5-hidroxitriptamina, ca și unii aminoacizi, alanina și glicina, ca substanțe transportoare posibile în regnul animal.

Într-un capitol final se face o prezentare a funcţiilor şi evoluţiei substanţelor transportoare în onto- şi filogenie; autorul încearcă astfel să-şi materializeze concepţia pe care şi-o mărturiseşte, încă de la început, prin cuvintele lui Goethe din motto-ul volumului: „În natura vie nu se întîmplă nimic care să nu fie în legătură cu întregul şi, chiar cînd faptele ne apar izolate, cînd le cercetăm ca elemente izolate, întrebarea care se pune este: cum găsim legătura dintre aceste fenomene?"

Cartea îl satisface pe cercetător nu numai pentru că prezintă un ansamblu de cunoştinţe interesante şi complete, ci, mai ales, pentru că descoperă direcţiile de cercetare pentru viitor, constituind un stimul pentru activitatea de cercetare în acest domeniu.

Sanda Rădulescu
Institutul de biochimie
Bucureşti

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici ca : Viaţa ştiinţifică, în care prin note scurte sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc., Recenzii, în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzuanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 63, sectorul 1.

1973 APR 23

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

N. SĂLĂGEANU, **Fotosinteza**, 1972, 243 p., 5 pl., 13 lei.

V. D. MÂRZA şi H. ARAŢEI, **Biomorfologia corticalei ovariene la mamifere**, 1972, 180 p., 2 pl., 8 lei.

P. RAICU, M. IONESCU-VARO, G. GANCEVICI şi GABRIELA MOISESCU, **Celula-structură. Ultrastructură şi funcţii**, 1972, 344 p., 12 pl., 26 lei.

I. DICULESCU, DOINA ONICESCU şi LETIŢIA MISCHIU, **Biologie celulară**, 1971, 420 p., 36 lei.

E. MACOVSCHI, **Biostructura**, 1969, 258 p., 18,50 lei.

M. ŞERBAN şi D. COTARIU, **Biochimia contracţiei musculare**, 1970, 240 p., 20,50 lei.

R. PORTOCALĂ şi L. POPA, **Acizii ribonucleici celulari şi virali**, 1966, 375 p., 8 pl., 26 lei.

M. G. BALŞ, **Imunofluorescenţa şi aplicaţiile ei în inframicrobiologie**, 1966, 285 p., 18 pl., 27 lei.

La revue „Studii şi cercetări de biochimie" paraît 4 fois par an. Le prix d'un abonnement annuel est de $ 5—. Toute commande à l'étranger sera adressée à Întreprinderea Rompresfilatelia, Boîte postale 2001, telex 011631, Bucarest, Roumanie, ou à ses représentants à l'étranger. En Roumanie, vous pourrez vous abonner par les bureaux de poste ou chez votre facteur.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 16, Nr. 1, P. 1—114, BUCUREŞTI, MARTIE 1973

I.P. „Informaţia" — c 2141

43816

Lei 20.—

F 1330

studii şi cercetări de biochimie

2

TOMUL 16

1973

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 16, nr. 2, p. 115—230, Bucureşti, iunie 1973

SCBIAS — 16 (2), 115—230 (1973)

COMITETUL DE REDACŢIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUŞANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacţie:

VICTOR GHEŢIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Preţul unui abonament anual este de 80 lei.

În ţară abonamentele se fac la oficiile poştale, agenţiile poştale, factorii poştali şi difuzorii voluntari din întreprinderi şi instituţii. Revista se poate procura (direct sau prin poştă) şi prin PUNCTUL DE DESFACERE din cadrul EDITURII ACADEMIEI.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se face prin Întreprinderea Rompresfilatelia, Căsuţa poştală 2001 — telex 011631, Bucureşti, România, sau prin reprezentanţii săi din străinătate.

Manuscrisele, cărţile şi revistele pentru schimb, precum şi orice corespondenţă, se vor trimite pe adresa Comitetului de redacţie al revistei „Studii şi cercetări de biochimie", Bucureşti, str. Docenţilor nr. 20, sectorul 1.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
Bucureşti, str. Gutenberg nr. 3 bis, sectorul 6

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
B I O C H I M I E

Tomul 16, nr. 2 1973

SUMAR

Pag.

S. BOTEA, V. GHEŢIE, Hidroliza subclaselor de imunoglobulină G umană cu catepsine parţial purificate 119

I. CORNOIU, Eliberarea glucidelor din biostructura plantulelor de orz sub influenţa azidei de sodiu 125

I. CORNOIU, O. GOZIA, Influenţa etiolării asupra aminoacizilor din biostructura plantulelor de grîu 131

V. ELEFTERESCU, Influenţa unor inhibitori metabolici introduşi în frunzele plantulelor de porumb asupra unor componente ale sucurilor vacuolar şi plasmatic 135

C. MIHAI, Alterarea unor funcţii mitocondriale prin acţiunea *in vitro* a oleilaminei 145

N. MOLDOVEANU, TR. BENŢIA, Activitatea izoenzimelor lactatdehidrogenazei M_4 şi H_4 purificate din muşchi şi inimă de iepure în prezenţa Na^+, K^+, Ca^{2+} şi Mg^{2+} 153

C. MOTAŞ, C. SARMANIOTI, Prezenţa disulfid-reductazei nucleotid-dependentă în ficatul de iepure 161

G. NEAMŢU, C. BODEA, Contribuţii la biosinteza carotenoidelor. VI. Biosinteza carotenoidelor din *Eschscholtzia californica* 171

D. PARASCHIVESCU, I. HURGHIŞIU, Modificări ale conţinutului în aminoacizi liberi la *Tetramorium caespitum* L. *(Formicidae-Hymenoptera)* colectat din zone diferite 181

D. POPOV, Fosfataza acidă din frunzele de porumb. Cercetări cromatografice. . 185

T. SLAVE, A. MIHAIL, N. BURMAZ, I. NIŢELEA, E. MARICA, Studii pentru oxidarea biologică a unor impurificatori din apele reziduale de la sinteza acrilonitrilului 195

H. D. SCHELL, F. IONESCU-STOIAN, Conjugate ale agarozei cu factori ai sistemului enzimatic plasminogen-plasmină 203

REFERAT GENERAL

I. MĂRGINEANU, R. OLINESCU, Acţiunea radiaţiilor ionizante asupra membranei eritrocitare 209

RECENZII 221

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

Tome 16, no. 2 1973

C O N T E N T S

Page

S. BOTEA, V. GHEŢIE, The hydrolysis of human IgG subclasses with partially purified cathepsins 119

I. CORNOIU, The release of sugars from the biostructure of wheat seedlings under the influence of sodium azide 125

I. CORNOIU, O. GOZIA, Influence of etiolation on the amino-acids from the biostructure of wheat seedlings 131

V. ELEFTERESCU, The influence of some metabolic inhibitors, introduced in maize plantlet leaves, upon some components from the vacuolar and plasmatic sap 135

C. MIHAI, Alteration of some mitochondrial functions under the action *in vitro* of oleylamine 145

N. MOLDOVEANU, TR. BENŢIA, The activity of M_4 and H_4 lactatedehydrogenase isoenzymes purified from muscle and rabbit heart, in the presence of Na^+, K^+, Ca^{2+} and Mg^{2+} 153

C. MOTAŞ, C. SARMANIOTI, Presence of NADPH-dependent disulfide-reductase in the rabbit liver. 161

G. NEAMŢU, C. BODEA, Contributions to the biosynthesis of carotenoids. VI. Biosynthesis of carotenoids in *Eschscholtzia californica* 171

D. PARASCHIVESCU, I. HURGHIŞIU, Modifications of the content in free amino-acids in *Tetramorium caespitum* L. *(Formicidae-Hymenoptera)* from different regions 181

D. POPOV, The acid phosphatase of maize leaves. Chromatographic investigations 185

T. SLAVE, A. MIHAIL, N. BURMAZ, I. NIŢELEA, E. MARICA, On the biological oxidation of some organic wastes in waste waters from the acrylonitrile synthesis 195

H. D. SCHELL, F. IONESCU-STOIAN, Agarose conjugates with some factors of the plasminogen-plasmine enzyme system 203

REVIEW

I. MĂRGINEANU, R. OLINESCU, Effects of ionizing radiations on the erythrocyte membrane 209

BOOKS REVIEW 221

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 2, 119–123 (1973)

ORSZÁGOS MŰSZAKI KÖNYVTÁRES DOKUMENTÁCIÓS KÖZPONT 1883

HIDROLIZA SUBCLASELOR DE IMUNOGLOBULINĂ G UMANĂ CU CATEPSINE PARȚIAL PURIFICATE

SIMONA BOTEA și VICTOR GHEȚIE

Rezumat. — Cele patru subclase de imunoglobulină G umană (IgG_1, IgG_2, IgG_3 și IgG_4) au fost supuse hidrolizei cu enzime proteolitice (papaină și catepsine). Nu s-a observat nici o diferență remarcabilă între cele patru subclase în cazul hidrolizatului cateptic, în timp ce papaina este capabilă să le diferențieze. Una dintre caracteristicile acțiunii catepsinelor este incapacitatea lor de a distruge fragmentul Fc pînă la fragment Fc′, în oricare dintre subclasele considerate.

Hidroliza IgG de om cu papaină a pus în evidență existența a două fragmente principale, Fab și Fc. Fragmentul Fab poartă situsul de combinare al anticorpilor, iar pe fragmentul Fc se găsește situsul de fixare al complementului. Fragmentul Fc este învestit, de asemenea, și cu capacitatea de a fixa molecula de IgG de receptori tisulari și celulari.

Prelungind hidroliza cu papaină a IgG, fragmentul Fc poate fi atacat mai avansat și furnizează un fragment cu o greutate moleculară de două ori mai mică decît a Fc, numit fragmentul Fc′.

Rezultatele menționate mai sus au fost obținute utilizînd preparate de IgG umană, care, de fapt, sînt un amestec din cele patru subclase (IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4).

Studiul hidrolizei celor patru subclase cu enzime proteolitice, pepsină [1], papaină [2], [3] și tripsină [4], a arătat că există diferențe notabile între felul în care sînt hidrolizați reprezentanții subclaselor. S-au propus metode imunoelectroforetice relativ simple de tipare a subclaselor, bazate pe comportarea particulară a fiecărei subclase la acțiunea uneia dintre cele trei enzime menționate.

IgG umană poate fi degradată la pH 3,5 de către fracțiuni lizozomale bogate în catepsină D, izolate din splină de om și bou [5]. Între produsele de digestie au fost identificate fragmente de tip Fab, Fc și Fc′, ultimele două într-o cantitate mai mică, sugerînd că scindarea lor poate fi avansată pînă la polipeptide neantigenice, cu greutate moleculară sub 12 000 [5].

În lucrarea prezentă am urmărit produșii de hidroliză ai subclaselor de IgG umană rezultați în urma acțiunii unui preparat de catepsină izolat și purificat parțial din lizozomi hepatici umani. Catepsina, principalul agent enzimatic implicat în catabolizarea intracelulară a imunoglobulinelor [6], ar putea hidroliza subclasele de IgG în mod diferit de celelalte enzime proteolitice studiate pînă în prezent, furnizînd infor-

maţii asupra structurii în domenii a acestei molecule. Hidroliza s-a urmărit imunoelectroforetic, comparîndu-se fragmentele rezultate de pe urma acţiunii catepsinei cu cele pe care le desprinde papaina din subclasele de IgG umană.

MATERIAL ŞI METODE

S-au utilizat reprezentanţi din fiecare subclasă de IgG (IgG_1K — Jennings; IgG_2K — Lloyd; IgG_3K — Dewsbury; IgG_3L — Lewis; IgG_4K — Griffiths), obţinuţi prin bunăvoinţa dr. G. Virella * (Oeiras, Portugalia). Imunoglobulinele au fost identificate, izolate şi purificate din seruri mielomatoase. S-a folosit un ser de porc anti-IgG umană, capabil să evidenţieze fragmentele proteolitice de tip Fab, Fc şi Fc', obţinut prin bunăvoinţa dr. N. St. Chişu (Spitalul „Dr. I. Cantacuzino", Bucureşti). S-a utilizat, de asemenea, pentru unele identificări, un ser de iepure anti-Fc uman (Sevac, Praga).

Extractul cateptic s-a obţinut astfel: s-a separat prin centrifugare între 6 000 şi 12 000 × g fracţiunea lizozomală dintr-un omogenat de ficat uman în zaharoză 0,25 M. Fracţiunea lizozomală s-a spălat repetat, prin centrifugare cu zaharoză 0,25 M, apoi s-a suspendat în apă distilată şi s-a precipitat, la rece, cu acetonă. Pulberea acetonică obţinută s-a separat prin centrifugare şi s-a uscat în vid, peste $CaCl_2$, după îndepărtarea prealabilă a excesului de acetonă prin evaporare forţată sub un curent de aer. S-au suspendat 10 mg pulbere acetonică în 1 ml soluţie de NaCl 0,145 M şi s-au extras, cu agitări ocazionale, la temperatura camerei. După 1 oră s-a centrifugat suspensia la rece, la 5 000 × g timp de 15 minute, iar supernatantul limpede, de culoare slab gălbuie, conţinînd 5 mg/ml proteină, s-a utilizat ca sursă de enzimă (soluţie de catepsină parţial purificată).

Hidroliza subclaselor de IgG cu catepsină s-a făcut după următorul model: s-au dizolvat 2 mg din preparatul de IgG dat în 0,2 ml dintr-o soluţie de tampon citrat-HCl pH 3,5, 0,2 M, peste care s-au adăugat 0,2 ml din soluţia de catepsină. S-au adăugat 1—2 picături de toluen, s-au închis etanş eprubetele şi s-au incubat la 37°C un timp care a variat între 1 şi 24 de ore. S-au efectuat probe de control paralele, în care, în loc de soluţia de enzimă, s-a adăugat doar soluţie de NaCl 0,145 M, şi altele în care s-a efectuat hidroliza cu papaină (NBCo, 3 × crist.) în tampon fosfat pH 7,0, 0,1 M, în prezenţa de cisteină 0,01 M şi $EDTANa_2$ 0,002M, un timp variabil (după Porter [7]).

După împlinirea timpului de hidroliză dorit, probele s-au aplicat imediat la imunoelectroforeză sau au fost congelate pînă la efectuarea analizei.

Analiza imunoelectroforetică s-a efectuat în gel de agaroză 1%, utilizînd tamponul barbital pH 8,5 cu putere ionică 0,05 în cuvele electrozilor şi 0,016 în plăci. S-a aplicat un curent de 5 V/cm timp de 3 ore, după care s-au folosit tehnicile uzuale de difuzie, spălare şi colorare [8].

* Căruia îi mulţumim şi pe această cale pentru amabilitatea cu care ne-a pus la dispoziţie eşantioanele de subclase de IgG şi pentru discuţiile purtate asupra acestei lucrări.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Prin hidroliza cu catepsină a IgG_1 se observă apariția a 2 linii de precipitare, care au fost identificate cu fragmentele Fab și Fc (fig.1). Linia Fab suferă o modificare de mobilitate în cursul hidrolizei, ocupînd după o hidroliză de 4 și de 24 de ore o poziție mai catodică, asemănătoare cu aceea pe care o ocupă fragmentul Fab provenit prin hidroliza cu papaină (fig. 1 *b*).

Deși s-au evidențiat și reacții de identificare totală între liniile Fab date de papaină și de catepsină (fig. 1 *d*), nu se poate afirma că cele două fragmente sînt identice, serul imun utilizat nefiind capabil să evidențieze regiunea balama a moleculei. Aceeași constatare se poate face și pentru linia Fc, prezentă chiar dacă hidroliza cu catepsină s-a prelungit 22 de ore și care a manifestat o reacție de identitate totală cu fragmentul papainic Fc (fig. 1*e*) și cu IgG_1 intactă (fig. 1*f*).

Catepsina, spre deosebire de papaină, nu desprinde un fragment de tip Fc′ la nici unul dintre intervalele de timp la care s-a cercetat hidroliza (1, 2, 4 și 24 de ore). De notat că papaina are tendința să distrugă fragmentul Fc′ desprins din Fc, fără însă a mai ataca o nouă cantitate din Fc desprins, astfel că, la 24 de ore, în hidrolizatul papainic s-a observat prezența fragmentelor Fab și Fc, dar nu și a Fc′.

Hidroliza IgG_2 decurge oarecum asemănător cu aceea a IgG_1. Se observă liniile de precipitare date de fragmentele Fab și Fc într-o poziție similară cu cea observată la IgG_1 (fig. 2*c*). Este de notat că IgG_2 are tendința spontană de a se autoliza prin incubare la pH 3,5 fără enzimă, efect care se manifestă prin reducerea considerabilă a arcului de precipitare (fig. 2*b*), dar nu prin apariția unor arcuri similare cu cele produse de catepsină sau papaină (fig. 2*c* și 2*d*).

Linia Fc dispare după o hidroliză de 24 de ore (spre deosebire de IgG_1), fără a se putea pune însă în evidență prezența fragmentului Fc′. Hidroliza cu papaină conduce la un aspect imunoelectroforetic caracteristic, în care prezența Fc′ poate fi dedusă numai prin inflexiunea liniei de precipitare date de Fc, spre extremitatea ei anodică (fig. 2*c*).

O comportare neobișnuită are tipul de IgG_3 utilizat de noi (fig. 3), care, spre deosebire de ceea ce se indică în literatură [4], nu a fost rapid distrusă de papaină pînă la fragmentul Fab, ci, chiar la 4 ore, a prezentat un fragment Fc intact. Fragmentul Fc′ nu a putut fi pus în evidență în hidrolizatele papainice, nici chiar la intervale de timp mai scurte (5, 15 și 30 de minute). Susceptibilitatea relativ scăzută la atacul cu papaină, prezentată de IgG_3 studiată, a fost constatată și prin hidroliza cu catepsină. Abia după o hidroliză de 2 ore, în amestecul de reacție apar liniile de precipitare pentru fragmentele Fab și Fc, linia fragmentului Fc menținîndu-se chiar și după 24 de ore de hidroliză.

Comparînd dinamica apariției fragmentelor la hidroliza cu papaină și la cea cu catepsină, se poate considera că IgG_3 apare relativ rezistentă la acțiunea catepsinei, comportarea sa fiind apropiată de aceea a IgG_1.

Mobilitatea electroforetică a subclasei IgG_4 este mult diferită de a celorlalte 3 subtipuri, ea fiind asemănătoare cu aceea a beta-2-globulinei. Hidroliza cu catepsină pune în evidență din nou fragmentele de tip Fab și Fc, în timp ce papaina eliberează și fragmentul Fc′ (fig. 4).

Se notează o diferenţă netă de mobilitate electroforetică între fragmentele Fab obţinute cu cele două enzime proteolitice, fragmentul Fab papainic avînd o mobilitate mai mică decît cel cateptic.

Examinînd rezultatele obţinute mai sus, se constată că, spre deosebire de papaină, catepsina nu este capabilă să desprindă, din molecula nici unui reprezentant al claselor de IgG, fragmente de tip Fc'. Această comportare este complet diferită de cea pe care o prezintă IgG de iepure hidrolizată cu catepsină, la care prezenţa fragmentelor de tip Fc' este frecventă [9].

Absenţa fragmentelor Fc', asociată cu apariţia unor fragmente de tip Fab cu o mobilitate electroforetică neobişnuită (în cazul IgG_1, IgG_2 şi IgG_4), sînt argumente că catepsina este capabilă să desprindă fragmente care ar putea avea dimensiuni similare cu ale fragmentului peptic $F(ab')_2$. Este de menţionat că proteinele aparţinînd celor două subclase de IgG (1 şi 4) au prezentat o diferenţă netă în ceea ce priveşte rezistenţa fragmentelor Fc şi Fc' la acţiunea papainei. Astfel, fragmentul Fc' din IgG_1 a apărut rezistent la atacul prelungit al papainei, în timp ce din IgG_4 s-a desprins un fragment Fc' care a fost distrus în cîteva ore de enzima proteolitică.

Subclasa IgG_3 nu apare mai susceptibilă la acţiunea catepsinei decît ceilalţi reprezentanţi, dar trebuie precizat că proteina IgG_3 cercetată de noi nu a prezentat o comportare deosebită faţă de celelalte subclase nici sub acţiunea papainei. Nu s-a observat eliberarea de fragment Fc', fragmentul Fc apărînd neaşteptat de rezistent la acţiunea papainei. Acest rezultat ar trebui confruntat cu hidroliza altor proteine de tip IgG_3.

Absenţa sistematică a fragmentului de tip Fc' în hidrolizatele subclaselor de IgG este în contrast cu rezultatele lui Fehr şi colab. [5], care au semnalat prezenţa unor componente cu antigenicitate Fc'. Deoarece papaina a putut desprinde din subclasele de IgG_1, IgG_2 şi IgG_4 astfel de fragmente, rezultă că datele neconcordante pot fi datorate faptului că autorii citaţi mai sus au utilizat un preparat eterogen de IgG sau că extractele lor lizozomale cuprindeau enzime proteolitice în plus faţă de extractul cateptic utilizat de noi.

CONCLUZII

1. Rezultatele obţinute sugerează că cele patru subclase prezintă o comportare foarte asemănătoare la acţiunea catepsinelor, spre deosebire de acţiunea papainei, ceea ce înseamnă că acţiunea catepsinelor nu poate discrimina subclasele de IgG.

2. Produşii de hidroliză rezultaţi sub acţiunea catepsinelor favorizează ideea că acest sistem enzimatic, cel puţin acela provenit din ficat, ar putea interveni în catabolizarea tuturor subclaselor de IgG.

3. Faptul că cele patru subclase au un timp de înjumătăţire diferit dovedeşte că reglarea catabolizării este efectuată de un alt sistem biochimic, în care acţiunea catepsinelor nu este implicată.

Prezentat la redacţie la 25 ianuarie 1973

Laboratorul de imunochimie,
Secţia de imunologie
Institutul de patologie şi genetică
medicală „Dr. Victor Babeş"
Bucureşti

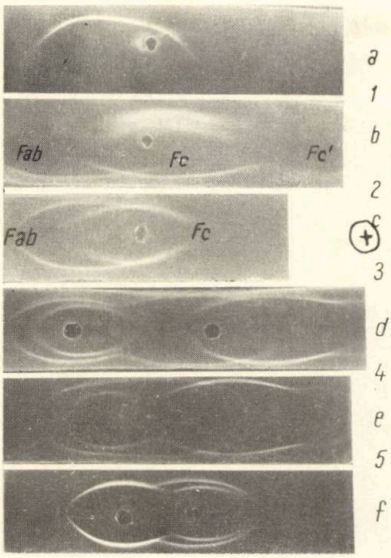


Fig. 1. — Analiza imunoelectroforetică a IgG_1 și a hidrolizatelor sale cu catepsină și papainā.

a — IgG_1 incubată fără enzimă, 2 ore; *b* — IgG_1 incubată cu papainā, 2 ore; *c* — IgG_1 incubată cu catepsină, 4 ore; *d* — identificarea hidrolizatului cateptic cu fragmentul papainic Fab; *e* — identificarea hidrolizatului cateptic cu fragmentul papainic Fc; *f* — identificarea hidrolizatului cateptic cu IgG; *1* — ser de iepure anti-fragment Fc (Sevac, Praga); *2* — *5* — ser de porc anti- (Fab + Fc + Fc').

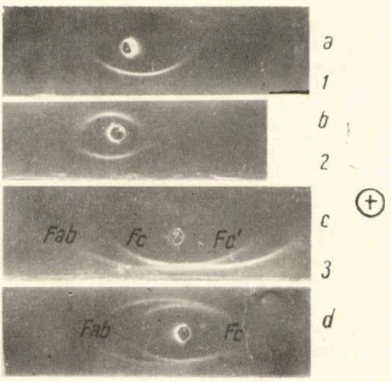


Fig. 2. — Analiza imunoelectroforetică a IgG_2 și a hidrolizatelor sale cu catepsină și papainā.

a — IgG_2 incubată fără enzimă, 5 ore; *b* — IgG_2 incubată fără enzimă, 24 de ore; *c* — IgG_2 incubată cu papainā, 5 ore; *d* — IgG_2 incubată cu catepsină, 5 ore; *1* — *3* — ser de porc anti- (Fab + Fc + Fc').

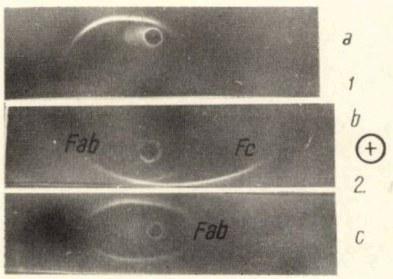


Fig. 3. — Analiza imunoelectroforetică a IgG_3 și a hidrolizatelor sale cu catepsină și papainā.

a — IgG_3 incubată fără enzimă, 2 ore; *b* — IgG_3 incubată cu papainā, 30 de minute; *c* — IgG_3 incubată cu catepsină, 2 ore; *1* — *2* — ser de porc anti-(Fab + Fc + Fc').

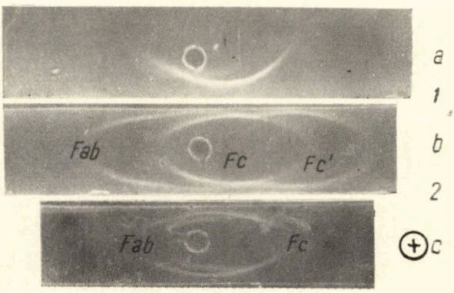


Fig. 4. — Analiza imunoelectroforetică a IgG_4 și a hidrolizatelor sale cu catepsină și papainā.

a — IgG_4 incubată fără enzimă, 2 ore; *b* — IgG_4 incubată cu papainā, 2 ore; *c* — IgG_4 incubată cu catepsină, 2 ore; *1* — *2* — ser de porc anti- (Fab + Fc + Fc').

BIBLIOGRAFIE

1. M. W. Turner, D. R. Stanworth, D. E. Normansell, H. H. Bennich, Biochim. biophys. Acta, **133**, 265 (1969).
2. S. Irimajiri, E. C. Franklin, B. Frangione, Immunochemistry, **5**, 383 (1968).
3. C. Rivat, L. Rivat, J. Bourguignon, C. Ropartz, Immunochemistry, **8**, 813 (1971).
4. J. Gergely, G. A. Medgyesi, A. C. Wang, H. H. Fudenberg, Immunochemistry, **9**, 589 (1972).
5. K. Fehr, J. Lospalluto, M. Ziff, J. Immunol., **105**, 973 (1970).
6. V. Gheţie, Microbiologia, Parazitologia, Epidemiologia, **4**, 317 (1972).
7. R. Porter, Biochem. J., **73**, 119 (1959).
8. V. Gheţie, V. Micuşan, *Analiza imunochimică*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1966.
9. V. Gheţie, C. Motaş, Immunochemistry, **8**, 89 (1971).

THE HYDROLYSIS OF HUMAN IgG SUBCLASSES WITH PARTIALLY PURIFIED CATHEPSINS

SUMMARY

The four subclasses of human IgG (IgG_1, IgG_2, IgG_3 and IgG_4) were submitted to hydrolysis with proteolytic enzymes (papain and cathepsins).

No remarkable differences between the four subclasses were observed in case of catheptic hydrolysate, while the papain is able to differentiate them. One of the characteristics of the cathepsin action is its inability to destroy the Fc fragment to Fc′ fragment of any subclasses.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 2, 125–129 (1973)

ELIBERAREA GLUCIDELOR DIN BIOSTRUCTURA PLANTULELOR DE ORZ SUB INFLUENȚA AZIDEI DE SODIU

IRINA CORNOIU

Rezumat. — S-a urmărit eliberarea glucidelor din biostructura plantulelor de orz sub acțiunea azidei de sodiu. S-a constatat că, pe măsură ce concentrația soluției de azidă de sodiu crește, se obține un volum din ce în ce mai mare de suc, mai bogat în glucide.

Experimental s-a dovedit că biostructura țesuturilor foliare conține zaharuri reducătoare, în cantități diferite după natura plantelor [1]. De asemenea s-a dovedit acțiunea inhibitorilor metabolici asupra biostructurii celulelor vii [2], acțiune care duce la eliberarea apei și a altor substanțe [3], cum ar fi : ionii de potasiu, calciu și sodiu, fosfații și fosfataza acidă, ribonucleaza, aminoacizii și zaharurile reducătoare. A fost arătată cantitatea globală a zaharurilor reducătoare din biostructura frunzelor plantulelor de porumb și grîu tratate cu 2,4 dinitrofenol și azidă de sodiu.

În lucrarea de față s-a urmărit să se determine prin cromatografie pe hîrtie tipurile de glucide care se găsesc în biostructura plantulelor de orz și influența pe care azida de sodiu, în concentrații crescînde, o exercită asupra lor. Pe lîngă determinările calitative au fost efectuate și determinări cantitative.

MATERIAL ȘI METODE

S-a lucrat pe plantule de orz în vîrstă de 2 săptămîni. Probele folosite în diferite variante au fost de 50 g. Pentru obținerea sucului vacuolar plantulele s-au stors la 150 atm în presa hidraulică Hafico. Reziduul rămas în presă a fost înghețat 24 de ore la —10°C și stors tot la 150 atm, obținîndu-se astfel sucul plasmatic.

Acțiunea azidei de sodiu asupra biostructurii plantulelor de orz s-a urmărit prin introducerea plantulelor timp de 24 de ore în soluții de azidă de sodiu de concentrații diferite : 0,005 g%, 0,05 g%, 0,5g%. Pentru proba-martor plantulele au fost introduse în apă distilată. După 24 de ore plantulele au fost scoase, spălate și uscate cu hîrtie de filtru. Stoarcerea s-a făcut tot la 150 atm.

Toate sucurile obținute au fost prelucrate pentru obținerea zaharurilor reducătoare. În acest scop au fost tratate cu alcool fierbinte și filtrate

după 24 de ore în capsule de porţelan. Probele au fost evaporate la sec pe o baie de apă.

Cromatografia pe hîrtie a glucidelor. Reziduurile din capsule au fost reluate cu alcool 80%. S-au aplicat probe de 0,04 ml pe hîrtie Whatman nr. 1. Lichidul de irigare a fost format din butanol: acid acetic: apă în proporţie de 4 :1 :5. S-a efectuat cromatografie descendentă, cu 3 recromatografieri succesive. Pe aceeaşi hîrtie cromatografică au fost aplicate probe de zaharuri martor (M/10). După terminarea irigării hîrtia cromatografică a fost scoasă şi uscată în curent de aer. S-a trecut la identificarea diferitelor tipuri de glucide cu ajutorul reactivilor specifici.

Astfel, esterii fosforici situaţi pe linia de start au fost identificaţi prin pulverizarea cromatogramei cu molibdat de amoniu (5) şi uscarea ei timp de 7′ la 85°C.

Aminozaharurile au fost identificate prin pulverizarea cromatogramei cu o soluţie etanolică de ninhidrină [5] cu care ele dau pete de culoare albastră.

Zaharurile reducătoare au fost puse în evidenţă prin imersarea cromatogramei într-un amestec format dintr-o soluţie de 0,5% clorură de trifenil tetrazoliu (TTC) cu o soluţie de hidroxid de sodiu 5% în alcool metilic 60% (1 :3). Tratarea cu acest reactiv se face la o temperatură puţin mai ridicată, de preferinţă la întuneric. Reacţia glucidelor cu acest reactiv conduce la apariţia unor pete roşii pe fond alb. Excesul de reactiv se spală cu apă sau se neutralizează prin imersare timp de cîteva minute în acid sulfuric 2N. Amintim că TTC dă reacţie şi cu aminozaharurile. Cromatograma a fost fotografiată.

Determinarea cantitativă a aminozaharurilor şi a zaharurilor reducătoare s-a făcut după procedeul lui Fischer şi Dörfel [5]. Eluţiile sînt citite la fotometru la 540 nm. Calculul s-a făcut în funcţie de extincţiile glucidelor-martor decupate de pe aceeaşi cromatogramă.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

După cum se vede din figura 1, în plantulele de orz au fost identificate următoarele tipuri de glucide: esteri fosforici (situaţi pe linia de start), aminozaharuri şi zaharuri reducătoare: galactoza, glucoza, fructoza şi riboza.

Tabela 1

Extincţiile aminozaharurilor în sucul vacuolar şi plasmatic al plantulelor de orz

Felul glucidelor	Felul sucului	
	vacuolar	plasmatic
Aminozaharuri	0,34	0,56

Aceste glucide se găsesc în cantitate mai mare în materia biostructurată decît în soluţia intracelulară. Astfel în tabela 1 sînt prezentate extincţiile aminozaharurilor din sucul vacuolar şi plasmatic, citite la fotocolorimetru. Se poate vedea că sucul plasmatic are o extincţie mai mare decît sucul vacuolar, deci are o concentraţie mai mare de aminozaharuri. La fel zaharurile reducătoare (tabela 2) se găsesc în concentraţie mai mare la sucul plasmatic decît în sucul vacuolar. Acest fapt iese mai bine în evidenţă din tabela 3, care cuprinde datele cu privire la cantită-

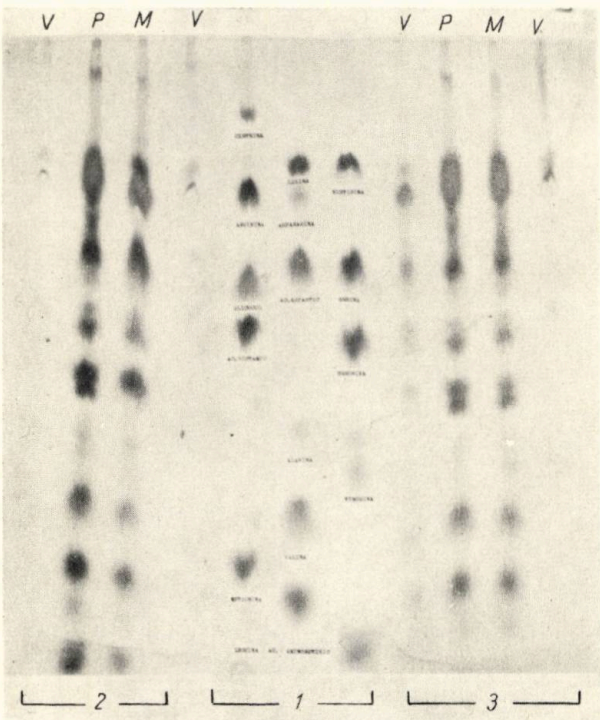


Fig. 1. — Cromatograma aminoacizilor martori (1) și din sucul vacuolar (*V*), plasmatic (*P*) și mixt (*M*) de la plante verzi (*2*) și etiolate (*3*).

ţile totale ale zaharurilor reducătoare din sucurile vacuolar şi plasmatic. Se constată că, deşi sucul plasmatic are un volum puţin mai mic decît sucul vacuolar, el conţine o cantitate mai mare de zaharuri reducătoare.

Tabela 4 cuprinde extincţiile aminozaharurilor de la plantulele-martor şi de la cele tratate cu concentraţii crescînde de azidă de sodiu.

Tabela 2

Conţinutul în zaharuri reducătoare din sucul vacuolar şi plasmatic al plantulelor de orz (mg/100 ml)

Zaharurile reducătoare	Felul sucului	
	vacuolar	plasmatic
Galactoza	138	440
Glucoza	180	240
Fructoza	108	148
Riboza	19	34

Tabela 3

Volumul sucului vacuolar şi plasmatic şi cantităţile de zaharuri reducătoare (mg) cuprinse în aceste sucuri

Zaharuri reducătoare	Felul sucului	
	vacuolar (18 ml)	plasmatic (17,5 ml)
Galactoza	25	77
Glucoza	32	42
Fructoza	19	26
Riboza	3	6

Se constată că la concentraţia minimă de azidă de sodiu (0,005 g%) valorile sînt aproape identice cu cele ale plantulelor-martor. Creşterea concentraţiei de azidă de sodiu de la 0,005 g% la 0,5 g% duce la o creştere treptată a concentraţiei acestor glucide în suc, şi anume de la extincţia de 0,35 la 1,1.

Tabela 4

Extincţiile aminozaharurilor în sucul plantulelor-martor şi tratate cu azidă de sodiu de concentraţii diferite

Felul glucidelor	Plantule-martor tratate cu apă	Plantule tratate cu soluţia de azidă de sodiu		
		0,005%	0,05%	0,5%
Aminozaharuri	0,32	0,35	0,8	1,1

Influenţa azidei de sodiu ca inhibitor metabolic rezultă mai bine din tabela 5, care indică volumele de suc şi zaharurile reducătoare cuprinse în ele. Din date rezultă că volumul de suc eliberat creşte cu creşterea concentraţiei de azidă de sodiu. Astfel, în timp ce la concentraţia minimă de 0,005 g% acest volum este identic cu cel de la plantulele-martor, creşterea concentraţiei de azidă de sodiu provoacă o creştere treptată a volumului de suc pînă la o valoare maximă ce se atinge la concentraţia azidei de 0,5 g%. Conţinutul procentual de zaharuri reducătoare este mai mic în sucul plantulelor-martor decît în sucul plantulelor tratate cu concentraţii progresive de azidă de sodiu. Azida de sodiu, provocînd destrămarea biostructurii, eliberează din aceasta şi cantităţi de apă cu atît mai însemnate cu cît este folosită în concentraţii mai ridicate. Cantitatea de zaharuri reducătoare eliberate din materia biostructurată creşte şi ea cu concentraţia azidei de sodiu, însă în mai mică măsură, din

care cauză concentrația în zaharuri a sucului obținut este mai mică în cazul folosirii azidei de sodiu 0,5 g% decît a azidei de sodiu 0,05 g%.

Tabela 5

Conținutul în zaharuri reducătoare al sucului de plantule de orz tratate cu azidă de sodiu de concentrații diferite și al plantulelor-martor

Zaharurile	Plantulele-martor tratate cu apă	Plantule tratate cu azidă de sodiu		
		0,005g%	0,05g%	0,5g%
	Volumul sucului stors la 150 atm (ml)			
	15	15	18,5	27,5
	Conținutul în zaharuri al sucului (mg/100 ml)			
Galactoză	127	300	930	830
Glucoză	180	187	470	360
Fructoză	107	116	422	360
Riboză	20	26	97	80
	Cantitatea de zaharuri în suc (mg)			
Galactoză	19	45	172	228
Glucoză	27	28	87	99
Fructoză	16	17	78	99
Riboză	3	4	18	22

CONCLUZII

— Biostructura plantulelor de orz conține cea mai mare parte din conținutul lor total de glucide.

— Temperatura de —10°C, care duce la destrămarea parțială a biostructurii, produce eliberarea numai a unei părți din glucidele cuprinse în biostructură.

— Azida de sodiu provoacă și ea destrămarea biostructurii plantulelor de orz, cu eliberare de zaharuri. Cu cît concentrația azidei de sodiu este mai mare, cu atît biostructura este mai profund destrămată și cantitatea de glucide eliberată este mai crescută.

Prezentat la redacție la 20 ianuarie 1973

Institutul de biochimie, București

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, C. Mușolan, Rev. roum. Biochim., **6**, 89 (1969).
2. E. Macovschi, St. cerc. biochim., **12**, 5 (1969).
3. E. Macovschi, V. Frunzeti, St. cerc. biochim., **12**, 19 (1969).
4. M. Rabega, St. cerc. biochim., **14**, 191 (1971).
5. I. M. Hais, K. Macek, *Cromatografia pe hîrtie*, Edit. tehnică, București, 1960.

THE RELEASE OF SUGARS FROM THE BIOSTRUCTURE OF WHEAT SEEDLINGS UNDER THE INFLUENCE OF SODIUM AZIDE

SUMMARY

The sugars, released from the biostructure of barley seedling, induced by sodium azide, was followed. We found that the higher is the concentration of sodium azide solution, the greater is the yield of the sap as well as the sugars content.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 2, 131–134 (1973)

INFLUENȚA ETIOLĂRII ASUPRA AMINOACIZILOR DIN BIOSTRUCTURA PLANTULELOR DE GRÎU

IRINA CORNOIU și OFELIA GOZIA

Rezumat. — S-au urmărit aminoacizii din biostructura și din soluția intracelulară a plantulelor de grîu verzi și etiolate. S-a constatat că biostructura și soluția intracelulară a plantulelor de grîu etiolate conțin mai mulți aminoacizi și în cantitate mai mare în comparație cu acelea ale plantulelor de grîu verzi.

Spre deosebire de căldură, lumina nu este o condiție absolută pentru creștere; totuși efectul primar al luminii asupra creșterii, fenomen ce se cunoaște sub numele de fotomorfogeneză, dovedește existența unui control asupra creșterii, dezvoltării și diferențierii unei plantule exercitat de lumina vizibilă, independent de fotosinteză [1], [2], [3].

Numeroase lucrări subliniază dependența sintezei proteice, la nivelul frunzei, de lumină, care influențează atît calitatea proteinelor, cît și cantitatea lor [4], [5], [6]. La plantulele etiolate de porumb s-a constatat scăderea mobilității electroforetice a fracțiunilor proteice cloroplastice, pusă pe seama scăderii cantității aminoacizilor ciclici și ramificați, și creșterea argininei și lizinei [7]. S-a semnalat de asemenea scăderea la plantele etiolate a vitezei de metabolizare a acidului glutamic [8]. Totodată, leguminoasele crescute la întuneric au prezentat un conținut mare de asparagină, conținut ce scade cu expunerea la lumină [9].

Aceste cercetări s-au efectuat însă pe extracte, deci se referă la modificări globale ale cantităților de substanțe și nu dau lămuriri în legătură cu repartiția aminoacizilor între biostructură și soluția intracelulară. De aceea, începînd cercetările noastre în problema etiolării, am luat în considerare acest aspect al problemei.

Am efectuat experiențe pe frunze etiolate și martor de grîu, urmărind, prin cromatografie pe hîrtie, calitatea și cantitatea de aminoacizi în sucurile vacuolar și plasmatic, știind că în primul caz obținem indicii cu privire la aminoacizii din soluția intracelulară, iar în cazul al doilea cu privire la cei din materia biostructurată.

MATERIAL ȘI METODE

S-a lucrat pe plantule de grîu etiolate și martor (verzi) în vîrstă de 2 săptămîni. Probe de 65 g grîu etiolat și martor s-au stors în presa hidraulică Hafico, la 150 atm. După o primă stoarcere s-a obținut sucul vacuolar, iar prin înghețarea reziduului la −10°C și stoarcere s-a obținut sucul plasmatic. Pentru obținerea sucului mixt plantulele de grîu etiolate și martor au fost înghețate la −10°C și apoi stoarse.

Pentru cromatografia pe hîrtie a aminoacizilor sucurile au fost centrifugate la 4 000 rot/min și trecute pe coloane de Zerolit 225 (3 RC 10) 4—5% DVC, 52—100 mesh. Cantitatea trecută pe coloane a fost de 20 ml. Pentru îndepărtarea substanțelor nereținute (ioni, glucide, acizi organici, lipide) se trec 50 ml apă distilată. Aminoacizii reținuți de rășină au fost eluați cu 300 ml dintr-o soluție amoniacală 5%. Reziduurile au fost prinse cantitativ în capsule de porțelan și evaporate la sec.

Cromatografia pe hîrtie a aminoacizilor. Reziduul din capsule a fost reluat cu 10 ml izopropanol 10% și s-au aplicat probe de 0,02 ml pe hîrtie Whatman nr. 1. Lichidul de irigare a fost format din butanol : acid acetic : apă (11 :11 :3). Evidențierea aminoacizilor s-a făcut prin pulverizare cu ninhidrină 0,3% în alcool etilic. Aminoacizii-martor (M/100) s-au aplicat în probe de 0,01 ml. Spoturile de aminoacizi au fost evidențiate calitativ în sucurile vacuolar, plasmatic și mixt ale plantulelor de grîu etiolate și martor. După 24 de ore spoturile individuale ale aminoacizilor, precum și martorii respectivi s-au decupat și introdus în complexul cu cadmiu. După 48 de ore probele au fost eluate cu alcool metilic. Eprubetele s-au agitat puternic pentru eluarea probelor, hîrtiuțele trebuind să rămînă albe. Eluțiile au fost fotometrate după 10 min la 540 nm. Calculul s-a făcut în funcție de extincțiile aminoacizilor-martor decupați după aceeași cromatogramă.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Figura 1 reprezintă cromatograma aminoacizilor, colorată cu ninhidrină. Se pot observa diferențe cantitative ale aminoacizilor între sucul vacuolar al plantulelor etiolate și al celor martor. Sucul vacuolar al plantulelor etiolate conține un număr de aminoacizi în plus față de sucul vacuolar al plantulelor-martor. Afară de diferențe calitative semnalate numai la sucul vacuolar, la cele două feluri de plantule apar și diferențe cantitative semnificative, la toate felurile de suc obținute din plantulele etiolate și martor. În tabela 1 sînt cuprinse concentrațiile aminoacizilor liberi, exprimate în mg la 100 ml suc. Se constată că sucul vacuolar al plantulelor-martor de grîu conține, în condițiile cercetărilor noastre, numai 3 aminoacizi din totalul de 12 aminoacizi prezenți în sucul vacuolar al plantulelor etiolate. Înseamnă că la plantulele de grîu etiolate biochimismul în care sînt interesați aminoacizii se produce altfel decît la plantulele de grîu verzi.

Între concentrațiile aminoacizilor din sucul plasmatic al plantulelor etiolate și martor se pot remarca unele diferențe semnificative. Așa cum s-a arătat în literatură, etiolarea duce la o scădere a intensității metabolismului unor aminoacizi, cu creșterea cantității de asparagină, lucru verificat de experiențele noastre. Astfel, în sucul plasmatic al plantulelor-martor concentrația asparaginei este de 33 mg %, iar în sucul plasmatic al plantulelor etiolate de 251 mg%.

Creșteri, însă mai mici, ale concentrației de aminoacizi în sucul plasmatic și mixt al plantulelor etiolate se pot observa la acidul aspartic și la metionină. Ceilalți aminoacizi sînt în concentrație mai mică.

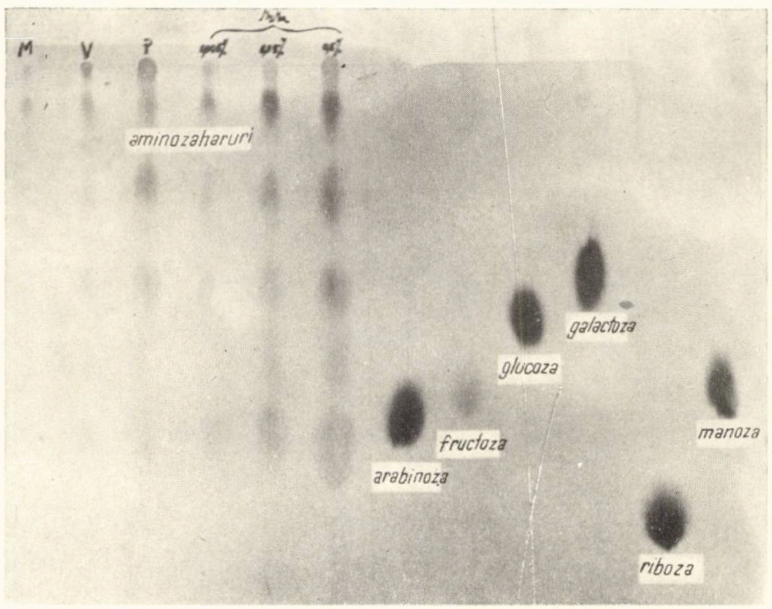


Fig. 1. — Glucidele din sucurile vacuolar (*V*) și plasmatic (*P*), precum și din sucul plantulelor-martor (*M*), tratate cu concentrații diferite de azidă de sodiu.

Tabela 1

Conținutul de aminoacizi liberi (mg /100 ml) din sucul vacuolar, plasmatic și mixt al plantulelor de grîu etiolate și martor

Aminoacizii	Plante-martor			Plante etiolate		
	Felul sucului			Felul sucului		
	vacuolar	plasmatic	mixt	vacuolar	plasmatic	mixt
Cisteina	0,15	54,0	23,0	7,0	42,0	42,0
Asparagina	—	33,0	16,0	96,0	251,0	271,0
Histidina	2,28	50,0	34,0	10,0	50,0	54,0
Acid aspartic	3,37	29,0	34,0	13,0	41,0	40,0
Glicocol	—	14,0	11,7	1,54	9,0	8,7
Acid glutamic	—	19,0	12,0	4,5	19,0	16,0
Treonina	—	26,6	12,5	6,6	22,0	17,0
Alanina	—	377,0	192,0	41,0	255,0	186,0
Tirosina	—	90,0	43,0	15,0	62,0	57,0
Metionina	—	45,0	10,0	5,0	47,0	26,0
Fenil-alanina	—	38,0	28,0	7,5	22,0	22,0
Leucina	—	46,0	39,0	8,0	42,0	42,0

Sucul mixt obținut din plantulele de grîu etiolate și martor, înghețate la —10°C, conține un număr de 9 aminoacizi din 12, în concentrație mai mare la plantulele etiolate.

Tabela 2 cuprinde volumul de suc vacuolar, plasmatic și mixt obținut din plantulele de grîu etiolate și martor și cantitățile de aminoacizi

Tabela 2

Volumul (ml) sucului vacuolar, plasmatic și mixt obținut din plantule de grîu etiolate și martor (65 g) și cantitățile de aminoacizi liberi (mg) cuprinse în aceste sucuri

Aminoacizii	Plante-martor			Plante etiolate		
	Felul sucului			Felul sucului		
	vacuolar 25 ml	plasmatic 20 ml	mixt 46 ml	vacuolar 16 ml	plasmatic 24 ml	mixt 40 ml
Cisteina	0,03	10,8	10,5	1,12	10,0	16,8
Asparagina	—	6,6	7,4	15,3	60,2	108,4
Histidina	0,57	10,0	15,6	1,62	12,0	21,6
Acid aspartic	0,84	5,8	15,6	2,11	9,8	16,0
Glicocol	—	2,8	5,4	0,25	2,2	3,5
Acid glutamic	—	3,8	5,5	0,73	4,6	6,4
Treonina	—	5,3	5,7	1,0	5,3	6,8
Alanina	—	75,4	88,0	6,6	61,2	74,4
Tirosina	—	18,0	19,7	2,4	14,9	23,0
Metionina	—	9,0	4,6	0,8	11,3	10,0
Fenil-alanina	—	7,6	13,0	1,2	5,3	8,8
Leucina	—	9,2	17,9	1,3	10,0	8,8

cuprinse în ele. După cum se poate observa, volumul de suc vacuolar obținut din plantulele etiolate este mai mic decît cel obținut din plantulele-martor, însă cantitatea celor 3 aminoacizi comuni ambelor tipuri de plantule este mult crescută la cele etiolate. La asparagină, cantitatea este de 10 ori mai mare la plantulele etiolate. În plus apar aminoacizi noi, care la sucul vacuolar al plantulelor-martor lipsesc.

Sucul plasmatic al plantulelor etiolate conţine cantităţi mai mari de asparagină, histidină, acid aspartic, acid glutamic, metionină şi leucină decît sucul plasmatic al plantulelor-martor. Treonina este singurul aminoacid care se găseşte în cantitate egală atît la plantulele etiolate, cît şi la cele martor.

În sucul mixt se observă, de asemenea, o serie de creşteri ale cantităţii de cisteină, asparagină, histidină, acid aspartic, acid glutamic, treonină, tirosină şi metionină la plantulele etiolate, deşi cantitatea de suc mixt este mai mică.

CONCLUZII

— Biostructura plantulelor de grîu etiolate conţine mai mulţi aminoacizi şi în cantitate mai mare decît biostructura plantulelor verzi de grîu.

— Soluţia intracelulară a plantulelor de grîu etiolate conţine şi ea un număr mult mai mare de aminoacizi decît soluţia intracelulară a plantulelor verzi.

— Arginina apare în cantitate foarte mare în biostructura plantulelor de grîu etiolate, în comparaţie cu biostructura plantulelor verzi.

Prezentat la redacţie la 20 ianuarie 1973

Institutul de biochimie,
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. N. A. Maximov, *Fiziologia plantelor*, Bucureşti, 1951.
2. H. Mohr, Annu. Rev. Plant. Physiol., **13**, 465 (1962).
3. H. Mohr, Ber. dtsch. Bot. Ges., **76**, 454 (1962).
4. G. Brawerman, Biochim. biophys. Acta, **61**, 313 (1962).
5. G. Brawerman, D. A. Hufnagel, E. Chargaff, Biochim. biophys. Acta, **61**, 340 (1962).
6. V. Gheţie, St. cerc. biochim., **10**, 357 (1967).
7. M. M. Sisakian, G. G. Melik-Sarkisian, Fisiol. Rast., **10**, 17 (1963).
8. A. W. Naylor, N. E. Tolbert, Physiol. Pl., **9**, 220 (1956).
9. T. Meirion, *Plant Physiology*, ed. J. A. Churchill, London, 1958, p. 285.

INFLUENCE OF ETIOLATION ON THE AMINO-ACIDS FROM THE BIOSTRUCTURE OF WHEAT SEEDLINGS

SUMMARY

The amino-acids from the biostructure and from the intracellular solution, respectively of etiolated and green wheat seedlings were fallowed. The biostructure and the intracellular solution of etiolated wheat seedlings contains more amino-acids and in greater amounts in comparison with that of green wheat plants.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 2, 135–143 (1973)

INFLUENȚA UNOR INHIBITORI METABOLICI INTRODUȘI ÎN FRUNZELE PLANTULELOR DE PORUMB ASUPRA UNOR COMPONENTE ALE SUCURILOR VACUOLAR ȘI PLASMATIC

VIORICA ELEFTERESCU

Rezumat. — S-a urmărit acțiunea fluorurii de sodiu, cloramfenicolului și a acidului monoiodacetic asupra activității piruvatului, fosforului anorganic, ionilor de calciu și potasiu din sucul vacuolar și sucul plasmatic al frunzelor plantulelor de porumb.

S-a constatat că fluorura de sodiu și acidul monoiodacetic provoacă destrămarea biostructurii, cu eliberarea în sucul vacuolar de piruvat, fosfor anorganic, ioni de potasiu și calciu și substanțe hidrosolubile, pe cînd cloramfenicolul provoacă creșterea componentelor de mai sus în sucul vacuolar, nu prin destrămarea biostructurii, ci, probabil, prin diferite reacții biochimice.

Într-o lucrare precedentă am constatat că dinitrofenolul și arsenitul de sodiu, acționînd probabil asupra unor sisteme enzimatice, produc creșterea concentrației piruvatului în soluția intracelulară, fără să afecteze cantitatea de piruvat din biostructura frunzelor de porumb [1].

Pornind de la acest fapt, am considerat necesar să extindem cercetarea folosind și alți inhibitori metabolici și să urmărim cantitatea și repartiția nu numai a piruvatului, ci și a altor componente, între biostructura și soluția intracelulară a frunzelor aceleiași plante.

Astfel am introdus în frunzele plantulelor de porumb fluorură de sodiu, cloramfenicol și acid monoiodacetic și am urmărit cantitatea de piruvat, fosfor anorganic, ioni de potasiu și calciu, precum și de substanțe hidrosolubile, atît în sucul vacuolar, cît și în cel plasmatic.

MATERIAL ȘI METODĂ

Am lucrat pe frunzele plantulelor de porumb (HS 301) în vîrstă de 12–15 zile, crescute în condiții de lumină artificială. Plantulele se tăiau de la colet, se legau în mănunchiuri de cîte 50 g și se introduceau cu tulpinile în soluții apoase de fluorură de sodiu 10^{-2} M, cloramfenicol 0,4% și acid monoiodacetic 10 mM. Experiența era însoțită de probe-martor (plantule introduse în apă). După 24 de ore, partea frunzelor care era introdusă în soluție se spăla cu apă distilată și se usca prin tamponare cu hîrtie de filtru. Pentru stoarcerea soluției intracelulare și

obținerea în acest fel a sucului vacuolar, frunzele se comprimau într-o presă hidraulică de laborator, tip Hafico, model II, prevăzută cu dispozitivul special pentru cantități mici de material. Presiunea se ridica treptat pînă la 150 atm și se menținea pînă cînd materialul înceta să mai cedeze suc (15 min erau în general de ajuns). Reziduul rămas în presă se omora prin înghețare (menținere timp de 48 de ore la —12°C), iar după dezghețare se storcea din el sucul plasmatic.

După măsurarea volumului, o parte din suc se deproteiniza cu acid tricloracetic (10 ml suc + 3 ml ATA 6%), în supernatant se dozau fosforul anorganic și piruvatul [1], [2], iar cealaltă parte a sucului se centrifuga (2500 r/m) și servea pentru determinarea indicelui de refracție (substanțe hidrosolubile) și a ionilor de potasiu și calciu (3). Datele obținute au fost valorificate prin calcul statistic, după metoda perechilor [4], [5].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Frunzele de porumb tratate cu fluorură de sodiu, cloramfenicol și acid monoiodacetic dau o cantitate sporită de suc vacuolar și o cantitate mai mică de suc plasmatic, în comparație cu frunzele-martor (vezi tabela 1); aceasta înseamnă că, sub influența acestor inhibitori, o parte din apa biostructurată s-a eliberat și s-a adăugat la soluția intracelulară. Prin urmare, inhibitorii menționați provoacă o destrămare parțială a biostructurii frunzelor plantulelor de porumb, cu eliberarea unei cantități de apă. Același fenomen a fost constatat și în cazul dinitrofenolului și arsenitului de sodiu [1].

În ceea ce privește piruvatul, nu toți inhibitorii utilizați se comportă la fel (vezi tabela 2): fluorura de sodiu acționează, se pare, asupra biostructurii, eliberează o cantitate de piruvat (49—25 = 24 mg), care se adaugă soluției intracelulare, și astfel cantitatea de piruvat din sucul plasmatic scade (de la 58 la 33 mg).

Acidul monoiodacetic, pe de altă parte, labilizează parțial biostructura, piruvatul eliberat îmbogățește sucul intracelular cu 51 mg (76—25 = 51). Făcînd însă suma 76 + 34 = 110, observăm că apare o cantitate de piruvat în plus față de martor (25 + 58 = 83), ceea ce duce la concluzia că acidul monoiodacetic, în afară că destramă parțial biostructura, are acțiune și asupra acelor reacții ale biochimismului celular care inhibă utilizarea piruvatului și face să se acumuleze în mediu.

Cloramfenicolul, la rîndul lui, nu are acțiune asupra biostructurii, cantitatea de piruvat din sucul plasmatic (59 mg) fiind egală cu aceea a sucului plasmatic martor, în schimb creșterea cantității de piruvat din sucul vacuolar (48—25 = 23) se datorește, probabil, acelor reacții biochimice care au loc și în cazul acidului monoiodacetic.

Pentru prezentarea mai evidentă a rezultatelor obținute prin dozarea unei alte componente, și anume a fosforului anorganic (vezi tabela 3), vom prezenta unele date din această tabelă sub o formă mai succintă (vezi tabela 4).

Prin acțiunea fluorurii de sodiu, cantitatea de fosfor anorganic din sucul vacuolar crește, iar cea din sucul plasmatic scade față de a martorului, exact cu aceeași valoare (842—391 = 451, iar 1162 + 451 = 1613) — deci acest inhibitor a exercitat o acțiune de destrămare asupra biostruc-

Tabela 1

Cantitatea (ml) de suc vacuolar obținută prin stoarcerea la 150 atm a frunzelor de porumb martor (M) și tratate (24 de ore, 20–22°C) cu soluții de fluorură de sodiu (NaF)10^{-2} M, cloramfenicol (ClF) 0,4% și acid monoiodacetic (I) 10 mM, cît și de suc plasmatic obținut prin stoarcerea reziduurilor respective omorite în prealabil prin înghețare la −12°C, timp de 48 de ore

Nr. crt.	Data	Vacuolar				Plasmatic			
		M	NaF	ClF	I	M	NaF	ClF	I
1	23.V.972	15	25	17	16	18	17	19	7
2	2.VI	15	24	22	25	19	8	18	7
3	12.VI	12	24	23	24	15	9	14	8
4	27.VI	12	25	21	24	17	10	14	12
5	7.VII	16	32	22	34	—	—	—	—
6	17.VII	27	30	26	32	27	11	14	5
7	24.VII	15	30	23	29	21	4	22	7
8	11.IX	18	23	20	23	22	20	17	14
9	26.IX	19	25	22	27	20	17	15	12
10	29.IX	20	22	22	22	15	11	16	12
11	13.X	14	23	20	20	18	13	20	12
12	26.X	13	21	20	23	20	15	13	11
13	10.XI	13	25	18	25	18	19	19	10
Media		16	25	21	25	19	13	17	10
Diferența față de martor		—	9**	5**	9**	—	−6**	2	−9**
DL		—	[7]	[3]	[4]	—	[5]	4	[5]

Cifrele în chenar reprezintă rezultate semnificative.

**: p = 0,01.

Tabela 2

Cantitatea de piruvat (mg) în sucul vacuolar obținut prin stoarcerea la 150 atm a frunzelor de porumb martor (M) și tratate (24 ore, 20–22°C) cu soluții apoase de fluorură de sodiu (NaF) 10^{-2} M, cloramfenicol (ClF) 0,4% și acid monoiodacetic (I) 10 mM, cît și în sucul plasmatic obținut prin stoarcerea reziduurilor respective omorîte în prealabil prin înghețare la −12°C, timp de 48 de ore

Nr. crt.	Data	Vacuolar				Plasmatic			
		M	NaF	ClF	I	M	NaF	ClF	I
1	23.V.1972	22	35	27	51	49	42	41	31
2	2.VI	33	53	50	75	51	22	45	24
3	12.VI	17	72	46	72	43	25	50	22
4	27.VI	19	72	42	48	53	29	28	33
5	7.VII	26	61	57	116	54	45	87	37
6	17.VII	35	45	36	58	46	27	39	15
7	11.IX	20	37	40	46	71	16	92	25
8	26.IX	30	50	66	78	52	27	45	41
9	13.X	36	57	58	86	76	38	84	50
10	26.X	21	36	62	113	64	33	53	41
11	10.XI	22	31	41	100	79	63	93	51
Media		25	49	48	76	58	33	59	34
Diferența față de martor		—	24**	23**	51**	—	−25**	1	−24**
DL		—	15	12	24	—	13	16	8

Cifrele în chenar reprezintă rezultate semnificative.
**: p = 0,01.

Tabela 3

Cantitatea de fosfor (γ) anorganic în sucul vacuolar obținut prin stoarcerea la 150 atm a frunzelor de porumb martor (M) și tratate (24 ore, 20—22°C) cu soluții de fluorură de sodiu (NaF) 10^{-2} M, cloramfenicol (ClF) 0,4% și acid monoiodacetic (I) 10 mM, cît și în sucul plasmatic obținut prin stoarcerea reziduurilor respective omorîte în prealabil prin înghețare la −12°C, timp de 48 de ore

Nr. crt.	Data	Vacuolar				Plasmatic			
		M	NaF	ClF	I	M	NaF	ClF	I
1	23.V.1972	375	625	459	960	1913	1445	2023	1050
2	2.VI	330	504	528	687	1638	550	1462	612
3	12.VI	312	984	759	1368	1559	855	1505	750
4	27.VI	258	937	850	660	673	1025	1260	870
5	7.VII	448	992	770	1734	—	—	—	—
6	11.IX	540	874	750	943	—	—	—	—
7	25.IX	703	1062	946	953	2265	1827	2062	1395
8	29.IX	—	—	—	—	1631	1181	1120	1245
9	13.X	350	908	560	1050	1777	910	1825	1215
10	26.X	286	630	660	897	1621	1125	1153	907
11	10.XI	305	900	648	937	1620	1544	1686	1062
Media		391	842	693	1019	1633	1162	1566	1011
Diferența față de martor		—	451**	302 *	628**	—	−471*	−67	−622*
DL		—	403	251	331	—	225	256	508

Cifrele în chenar reprezintă rezultate semnificative.

*: p = 0,05.

**: p = 0,01

turii şi de eliberare a fosforului mineral în soluţia intracelulară. Acelaşi fenomen se observă şi în cazul acidului monoiodacetic, acţiunea de destrămare a biostructurii fiind însă ceva mai puternică. În cazul cloramfenicolului se constată că în sucul plasmatic cantitatea de fosfor este aceeaşi cu a sucului plasmatic martor, deci nu s-a exercitat acţiunea de

Tabela 4

Cantitatea de fosfor anorganic (γ) în sucul vacuolar, plasmatic şi mixt

	Vacuolar	Plasmatic	Mixt
martor	391	1 633	2 024
NaF	842	1 162	2 004
ClF	693	1 566	2 259
I	1 019	1 011	2 030

destrămare asupra biostructurii, în schimb cantitatea de fosfor din sucul vacuolar a crescut aproximativ de 1,5 ori faţă de a martorului; acest surplus se datoreşte, probabil, unor acţiuni biochimice de natură enzimatică. Se constată deci că dinamica eliberării de fosfor anorganic este aproximativ aceeaşi cu a piruvatului.

O altă componentă urmărită au fost ionii de potasiu şi de calciu (vezi tabela 5). S-a constatat că îngheţarea eliberează din biostructură o cantitate aproximativ de 3 ori mai mare de ioni de potasiu (23 mg; 61 mg) şi numai de 2 ori mai mare de ioni de calciu (9 mg; 17 mg).

În ceea ce priveşte tratamentul cu inhibitori, se constată şi în cazul componentelor amintite mai sus o asemănare în acţiunea fluorurii de sodiu şi a acidului monoiodacetic. Aceşti compuşi produc o acţiune de destrămare a biostructurii, o eliberare de ioni, trecerea acestora în soluţia intracelulară şi o scădere a cantităţii lor în sucul plasmatic; astfel, cantitatea de ioni devine de două ori mai mare în soluţia intracelulară a plantelor tratate decît în cea a martorului. Cloramfenicolul, în schimb, nu are acţiune asupra biostructurii, cantitatea de ioni rămînînd în sucul plasmatic aceeaşi cu a martorului; creşterea acestora în sucul vacuolar se datoreşte, probabil, unor fenomene biochimice.

O ultimă componentă urmărită în lucrare sînt substanţele hidrosolubile, exprimate în zaharoză (vezi tabela 6). Şi în acest caz fluorura de sodiu şi acidul monoiodacetic provoacă destrămarea biostructurii şi eliberarea unei cantităţi de substanţe hidrosolubile în soluţia intracelulară. Cloramfenicolul nu acţionează asupra biostructurii, cantitatea de substanţe hidrosolubile rămînînd la fel atît în soluţia intracelulară, cît şi în sucul plasmatic, ca în sucurile provenite de la plantele-martor. Faptul că cloramfenicolul nu are acţiune asupra biostructurii l-am constatat şi în cazul urmăririi eliberării RN-azei din biostructura frunzelor plantulelor de porumb [3].

Tabela 5

Cantitatea (mg) de ioni de K+ și Ca++ în sucul vacuolar obținut prin stoarcerea la 150 atm a frunzelor de porumb martor (M) și tratate (24 ore, 20–22°C) cu soluții de fluorură de sodiu (NaF) 10^{-2} M, cloramfenicol (ClF) 0,4% și acid monoiodacetic (I) 10 mM, cît și în sucul plasmatic obținut prin stoarcerea reziduurilor respective omorîte în prealabil prin înghețare la –12°C, timp de 48 de ore

Nr. crt.	Data	Vacuolar								Plasmatic							
		M		NaF		ClF		I		M		NaF		ClF		I	
		K+	Ca++	K+	Ca++	K+	Ca++	K+	Ca++	K+	Ca++	K+	Ca++	K+	Ca++	K+	Ca++
1	2.VI.1972	38	6	75	12	57	12	80	17	70	12	60	11	76	15	28	4
2	12.VI	31	4	72	10	59	11	86	16	75	12	26	4	67	11	28	4
3	27.VI	16	8	60	21	38	13	36	17	57	9	30	5	52	8	30	5
4	7.VII	34	11	75	18	48	15	85	21	51	11	39	7	37	10	28	7
5	24.VII	21	9	82	17	36	19	35	35	89	29	32	9	50	13	18	4
6	11.IX	19	10	30	16	23	14	23	16	73	21	15	4	75	26	22	6
7	26.IX	19	16	32	21	28	23	28	22	46	21	34	15	37	11	28	10
8	13.X	14	7	38	20	24	14	29	17	40	20	32	14	30	15	25	10
9	26.X	27	8	59	15	48	18	59	23	41	18	27	9	43	17	27	8
10	10.XI	15	12	31	28	23	20	29	28	70	18	45	14	44	12	32	9
Media		23	9	55	18	38	16	49	21	61	17	34	9	51	14	27	7
Diferența față de martor		—	—	32**	9**	15**	7**	26**	12**	—	—	–27**	–8**	–10	–3	–35**	–10**
DL		—	—	16	4	8	2	19	6	—	—	20	7	10	4	19	6

Cifrele în chenar reprezintă rezultate semnificative.
**: p = 0,01.

Tabela 6

Cantitatea de substanțe hidrosolubile (g zaharoză) în sucul vacuolar obținut prin stoarcerea la 150 atm a frunzelor de porumb martor (M) și tratate (24 ore, 20 – 22°C) cu soluții de fluorură de sodiu (NaF) 10^{-2} M, cloramfenicol (ClF) 0,4% și acid monoiodacetic (I) 10 mM, cît și în sucul plasmatic obținut prin stoarcerea reziduurilor respective omorîte în prealabil prin înghețare la – 12°C, timp de 48 de ore

Nr. crt.	Data	Vacuolar				Plasmatic			
		M	NaF	ClF	I	M	NaF	ClF	I
1	23.V.1972	0,28	0,49	0,31	0,33	0,72	0,55	0,69	0,49
2	2.VI	0,19	0,43	0,27	0,45	0,61	0,23	0,53	0,24
3	7.VII	0,20	0,60	0,43	0,67	0,68	0,48	0,69	0,27
4	11.IX	0,24	0,45	0,36	0,45	0,89	0,73	0,69	0,59
5	26.IX	0,37	0,56	0,55	0,59	0,90	0,71	0,69	0,49
6	29.IX	0,50	0,43	0,40	0,45	0,71	0,65	0,74	0,50
7	13.X	0,24	0,57	0,41	0,50	0,85	0,33	0,92	0,53
Media		0,30	0,50	0,40	0,50	0,80	0,50	0,70	0,40
Diferența față de martor		—	0,20*	0,10	0,20*	—	−0,30**	−0,10	−0,40**
DL		—	0,13	0,15	0,13	—	0,24	0,15	0,04

Cifrele în chenar reprezintă rezultate semnificative.

*: p = 0,05.

**: p = 0.01.

CONCLUZII

Soluţiile diluate de inhibitori metabolici (fluorură de sodiu, cloramfenicol şi acidul monoiodacetic) introduse în frunzele plantulelor de porumb provoacă destrămarea parţială a biostructurii, cu eliberarea de apă care se adaugă la soluţia intracelulară a ţesutului foliar.

Fluorura de sodiu şi acidul monoiodacetic, introduse în frunze, provoacă destrămarea parţială a biostructurii; acest proces face pe de o parte să crească cantitatea de piruvat, fosfor mineral, ioni de potasiu şi de calciu şi de substanţe hidrosolubile în sucul vacuolar, iar pe de altă parte să scadă cantitatea acestor componente în sucul plasmatic.

Cloramfenicolul, introdus în frunze, provoacă creşterea cantităţii de piruvat fosfor, anorganic, ioni de potasiu şi de calciu şi de substanţe hidrosolubile în sucul vacuolar, dar nu pe seama destrămării biostructurii, cantitatea acestor componente în sucul plasmatic rămînînd neschimbată faţă de martori.

Prezentat la redacţie la 16 ianuarie 1973

Institutul de biochimie,
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, V. Elefterescu, Rev. roum. Biochim., **9**, 193 (1972).
2. E. Macovschi, V. Elefterescu, Rev. roum. Biochim., **5**, 165 (1968).
3. V. Elefterescu, St. cerc. biochim., **14**, 269 (1971).
4. H. Sluşanschi, St. cerc. biochim., **8**, 345 (1965).
5. M. Steinbach, *Prelucrarea statistică în medicină şi biologie*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1961, p. 321.

THE INFLUENCE OF SOME METABOLIC INHIBITORS, INTRODUCED IN MAIZE PLANTLET LEAVES, UPON SOME COMPONENTS FROM THE VACUOLAR AND PLASMATIC SAP

SUMMARY

The influence of sodium fluoride, chloramphenicol and monoiodoacetic acid upon the amount of pyruvate, phosphate, K^+ and Ca^{++} ions and water soluble components from the intracellular solution and plasmatic sap of the maize plantlet leaves was followed.

Sodium fluoride and monoiodoacetic acid induce a partial breakdown of the biostructure with release in intracellular solution of pyruvate, phosphate, K^+ and Ca^{++} ions and water soluble components, whereas chloramphenicol induces the increase in the amount of the same components in intracellular solution not through the breakdown of the biostructure but through various biochemical reactions.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 2, 145–151 (1973)

ALTERAREA UNOR FUNCȚII MITOCONDRIALE PRIN ACȚIUNEA *IN VITRO* A OLEILAMINEI

CORNELIA MIHAI

Rezumat. — S-a cercetat influența oleilaminei asupra unor funcții mitocondriale, *in vitro*. În acest scop s-au efectuat determinări pe mitocondrii de ficat de șobolan, cercetîndu-se următoarele aspecte funcționale ale mitocondriei: fosforilarea oxidativă, umflarea pseudoenergetică, umflarea energetică, capacitatea de tamponare.

Rezultatele arată că prezența oleilaminei *in vitro* duce la alterarea acestor funcții mitocondriale, probabil datorită unei alterări structurale.

Unul din mecanismele prin care acizii grași nesaturați, ca și unii derivați ai lor, își exercită acțiunea asupra mitocondriilor este decuplarea fosforilării oxidative [1], [2]. Inhibarea cu oleat a transportului de ATP prin membranele mitocondriale [3], precum și inhibarea sistemului de schimb mitocondrial între ATP și fosfatul anorganic, concomitent cu inhibarea ATP-azei mitocondriale [4], au evidențiat interferența acestor compuși derivați din acizii grași nesaturați cu procesele energetice mitocondriale.

Prezența unor substanțe specifice poate altera comportarea normală a mitocondriilor, de furnizare a energiei și de translocare a ionilor permeanți.

Procesele energetice în reacțiile de cuplare depind de un ciclu de modificări ale conformației mitocondriale, ciclu intrinsec fosforilării oxidative și translocării energetice a ionilor prin membranele mitocondriale [14].

Pe baza acestor considerente, am încercat în lucrarea de față să urmărim unele aspecte ale acțiunii *in vitro* a oleilaminei asupra unor funcții mitocondriale, ca fosforilarea oxidativă, umflarea pseudoenergetică și energetică, capacitatea de tamponare.

MATERIAL ȘI METODĂ

Mitocondriile de ficat de șobolan s-au preparat prin metoda Hogeboom și Schneider (5), utilizînd ca mediu de separare și de reluare zaharoză 0,25 M, EDTA-Na_2 0,006 M în tampon Tris-HCl 0,005 M, pH 7,4. Suspensia finală conținea 40 mg proteină/ml. Toate operațiile au fost efectuate la 4°C; preparatele mitocondriale aveau cel mult 5 ore. Proteina s-a dozat prin metoda Folin [6].

Oleilamina (Koch-Light) s-a distilat sub vid şi apoi s-a preparat clorhidratul prin precipitarea în alcool absolut cu HCl fumans. Precipitatul filtrat s-a uscat sub vid. Preparatul astfel obţinut este solubil în apă, soluţiile preparîndu-se în momentul utilizării.

Fosforilarea oxidativă s-a urmărit prin metoda Borst [2]. Compoziţia mediului de determinare este dată în legenda tabelei; s-au calculat coeficientul respirator, pentru exprimarea consumului de oxigen, şi cîtul de fosforilare, ca măsură a cuplării respiraţiei cu fosforilarea.

Umflarea pseudoenergetică şi energetică s-au măsurat cu ajutorul metodelor recomandate de Blondin [7], [8], iar umflarea în fosfat de amoniu s-a determinat după Tyler [9], urmărind creşterea volumului mitocondrial prin scăderea densităţii optice a suspensiilor de mitocondrii, la un spectrofotometru universal Zeiss tip A, la 25°C, d=1 cm, $\lambda = 520$ mμ, metodă utilizată şi în alte lucrări (10). Compoziţia mediilor de umflare este dată în legenda figurilor.

Capacitatea de tamponare a mitocondriilor s-a urmărit prin metoda propusă de Rossi şi Carafoli [11], 20 min, 25°C, la un pH-metru Radiometer tip 22. Compoziţia mediului se găseşte în legenda figurii 4, iar detaliile de lucru în [12].

Rezultatele sînt media a 8 preparate mitocondriale; toate determinările s-au făcut în probe duble.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Fosforilarea oxidativă

Cînd s-a urmărit *in vitro* efectul oleilaminei asupra capacităţii de fosforilare oxidativă a mitocondriilor, s-a găsit o decuplare a mitocondriilor ce fosforilau în prezenţa acestei substanţe (tabela 1). Din datele prezentate se constată că această decuplare nu se datorează unei respiraţii modificate (Q_{O_2}) faţă de martor; scăderea cîtului de fosforilare (P/O)

Tabela 1

Influenţa oleilaminei asupra fosforilării oxidative a mitocondriilor de ficat de şobolan

Determinările s-au realizat la 30°C, timp de 30 min, într-un volum de reacţie de 3 ml, ce conţinea KF (15 mM), $MgCl_2$ (8 mM), EDTA-Na_2 (2 mM), KCl (10 mM), zaharoză (67 mM), succinat de sodiu (20 mM), tampon fosfat (30 mM), mitocondrii (8 mg), ADP (2,5 mM), ATP (0,3 mM), glucoză (34 mM), hexokinază (4 mg), OA·HCl (0,09 moli), după o incubare prealabilă de 15 min [2]

	Martor	OA·HCl
ΔO	2,00	2,06
ΔP	2,62	1,78
P : O	1,31	0,86
Q_{O_2}	10,13	10,41

ΔO = μatomi de oxigen consumaţi
ΔP = μmoli de fosfat esterificat
Q_{O_2} = μl O_2/mg proteină/oră

cu aproximativ 34% se realizează prin micșorarea cantității de fosfat esterificat (ΔP).

Decuplarea fosforilării oxidative a mitocondriilor de ficat de șobolan în prezența unor acizi grași nesaturați [13] a fost însoțită și de inhibarea respirației. Faptul că decuplarea fosforilării oxidative în prezența oleilaminei nu este simultană cu o respirație deficitară dovedește interferența acestei substanțe cu mecanismele mitocondriale de sinteză a compușilor macroergici.

Umflarea pseudoenergetică

Cum variația configurației mitocondriale este intrinsecă fosforilării oxidative [14], am urmărit, în continuare, capacitatea mitocondriilor de ficat de șobolan de a-și modifica volumul în diverse condiții de umflare, în prezența oleilaminei.

Într-o primă etapă s-a urmărit capacitatea mitocondriilor de a încorpora pasiv ioni monovalenți (umflarea pseudoenergetică [7]) în prezența unor concentrații crescînde de oleilamină. În mod normal, mitocondriile de ficat încorporează o cantitate mică de ioni K^+, în soluții izoosmotice de KCl sau KAc* ce conțin inhibitori ai transferului de electroni sau stimulatori ai hidrolizei ATP (KCN, DNP). Dacă primele două concentrații de oleilamină utilizate (0,035 și 0,050 μ moli/mg proteină) (fig. 1) măresc de 3 și, respectiv, 6 ori valoarea umflării mitocondriilor-martor, celelalte două concentrații (0,090 și, respectiv, 0,180 μ moli/mg proteină) oferă o

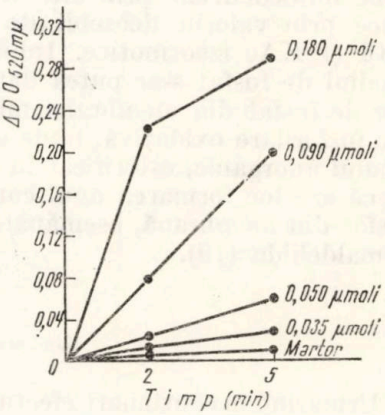


Fig. 1. — Influența diferitelor concentrații de OA·HCl asupra umflării pseudoenergetice în KCl 0,15 M, pH 7,4. Mitocondriile (1 mg proteină) s-au suspendat într-un mediu de KCl 0,15 M, Tris – HCl (0,03 μmoli/mg proteină), pH 7,4, conținînd DNP (0,1 mM) și KCN (5 mM). Volum total 3 ml [7].

mărire a volumului mitocondrial de 20 și, respectiv, 29 de ori în comparație cu mitocondriile netratate cu oleilamină. Concentrații și mai mari din această substanță nu au dus la o creștere a umflării pseudoenergetice peste această valoare, sugerînd atingerea unei limite în acțiunea oleilaminei asupra permeabilității membranei externe mitocondriale pentru

* S-au folosit următoarele prescurtări: OA·HCl (clorhidrat de oleilamină), DNP (2,4-dinitrofenol), KAc (acetat de potasiu).

ionul K^+ (umflarea pseudoenergetică se referă la integritatea membranei externe mitocondriale [7]). Urmărirea umflării pseudoenergetice în KAc 0,15 M, pH 7,4, oferă o creştere de peste 7 ori a volumului mitocondrial sub influenţa oleilaminei.

Experienţele de transport prin membranele mitocondriale au sugerat existenţa unor sisteme transportoare de ioni, inclusiv pentru fosfatul

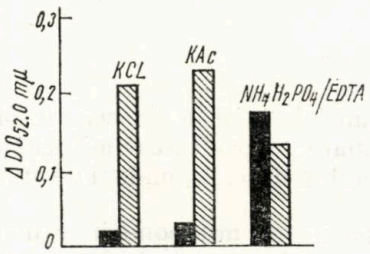


Fig. 2. — Influenţa OA·HCl asupra umflării pseudoenergetice a mitocondriilor de ficat de şobolan.

Martor ▨ OA·HCl (0,09 μmoli/mg proteină) Mitocondriile s-au suspendat în următoarele soluţii: — KCl 0,15 M, Tris—HCl (0,03 mmoli/mg proteină), pH 7,4 conţinînd DNP (0,1 mM) şi KCN (5 mM) [7]; — KAc 0,15 M, Tris — acid acetic (0,03 moli/mg proteină), pH 7,4 conţinînd DNP (0,1 mM) şi KCN (5 mM) [7]; — $NH_4H_2PO_4$ (0,1 M), Tris — HCl (5 mM), pH 7,4 conţinînd EDTA-Na_2 (0,1 mM), DNP (0,1 mM) şi KCN (5 mM) [9]. Volum total 3 ml.

anorganic (15), iar penetrarea ionului NH_4^+ este facilitată de prezenţa acestui anion permeant. Rezultatele referitoare la umflarea pseudoenergetică în $NH_4H_2PO_4$, prezentate în figura 2, sugerează o uşoară inhibiţie a capacităţii mitocondriilor de a se umfla în acest mediu, în prezenţa oleilaminei.

Se poate spune deci că oleilamina acţionează asupra membraneil externe mitocondriale prin alterarea permeabilităţii acesteia, ceea ce se traduce prin valorile deosebit de ridicate ale umflării pseudoenergetice în KCl şi KAc izoosmotice. Inhibiţia de aproximativ 13% a umflării în mediul de fosfat s-ar putea datora unei inactivări a sistemului transportor de fosfat din membrana mitocondrială. Corelînd acest rezultat cu cel de fosforilare oxidativă, unde cîtul de fosforilare era scăzut pe seama fosfatului anorganic, esterificat în cantitate mai mică, s-ar putea presupune că are loc formarea unui complex între oleilamină şi transportorul de fosfat din membrană, asemănător complexelor formate cu mercurialele şi formaldehida (19).

Umflarea energetică

Urmărind în continuare efectul oleilaminei asupra celeilalte membrane mitocondriale, cea internă, s-a determinat umflarea energetică în KAc izoosmotic. Prin acest tip de umflare, mitocondria încorporează activ ioni, forţa care determină procesul fiind fie transferul de electroni, fie hidroliza ATP; umflarea energetică în KAc duce la o concentraţie internă a ionilor translocaţi egală cu cea externă. Rezultatele prezentate în figura 3 dovedesc o reducere de 7 ori a capacităţii mitocondriilor de ficat de a se umfla activ în prezenţa oleilaminei, atît atunci cînd transportul activ s-a făcut pe seama oxidării substratului endogen, cît şi atunci cînd s-a oxidat substrat exogen (succinat). Compoziţia mediului

este dată în legenda figurii 3. Cînd translocarea energetică a ionilor s-a făcut prin hidroliza ATP adăugat, oleilamina a indus o scădere a umflării energetice pînă la o treime din valoarea martorului.

În ciclul de transformări conformaționale ale mitocondriei, tranziția de la starea neenergetizată a membranei interne la cea energetizată necesită prezența substratului (endogen sau exogen) sau a ATP

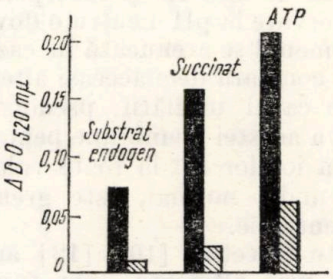


Fig. 3. — Influența oleilaminei asupra umflării energetice în KAc 0,15 M. ■ Martor ▨ OA·HCl (0,09 μmoli/mg proteină) Mitocondriile s-au suspendat în KAc 0,15 M, Tris – acid acetic (0,03 mmoli/mg proteină), pH 7,4; pentru determinarea umflării în prezența unor surse exogene, mediul a mai conținut succinat de sodiu (0,015 mmoli) sau ATP-Na_2 (0,0025 mmoli). Volum total 3 ml [8].

[16]; valoarea mică a umflării energetice, observată în prezența oleilaminei, sugerează instalarea unei inerții a membranei interne și deci o viteză mai mică de tranziție de la forma neenergetizată a membranei interne la cea energetizată.

Capacitatea de tamponare

Asociat fosforilării oxidative și deci modificărilor conformaționale concomitente acesteia, are loc un schimb de protoni prin membrana mitocondrială externă [17], schimb care, la același pH, este paralel cu scăderea densității optice a suspensiilor mitocondriale [18]. Comportarea mitocondriilor la diferite valori de pH (capacitate de tamponare) include două procese: încorporarea de protoni și eliminarea de ioni K^+ intra-

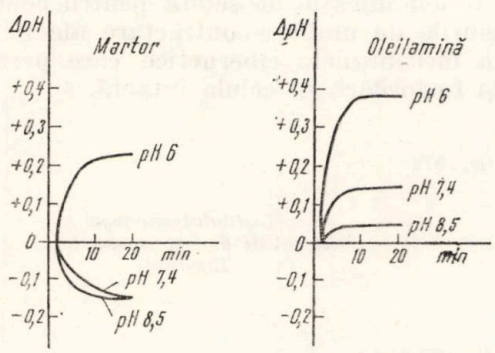


Fig. 4. — Variația capacității de tamponare a mitocondriilor de ficat de șobolan în prezența oleilaminei. Mitocondriile (5 mg proteină) s-au suspendat în KCl 0,1 M, Tris – HCl (3 mM) cu valorile de pH indicate. Concentrația OA·HCl a fost 0,09 μ moli/mg proteină. Volum total 5 ml [11].

mitocondriali, procese ce depind de pH-ul soluției externe, de concentrația și de starea mitocondriilor [11].

Capacitatea de tamponare a mitocondriilor de ficat, cu sau fără adaos de oleilamină, s-a urmărit în soluții de KCl la trei valori de pH diferite. Compoziția mediului este dată în legenda figurii 4. La pH acid,

adăugarea oleilaminei, după ce s-a stabilizat transferul de ioni al mitocondriei (1 min), duce la o creştere a eliminării de ioni K^+ în mediu, deci la o creştere a pH-ului soluţiei, cu aproximativ 65 % faţă de valoarea atinsă de mitocondriile-martor. La pH neutru, mitocondriile încorporează ioni K^+, eliminînd protoni, ceea ce se traduce prin scăderea pH-ului mediului. Adăugarea oleilaminei duce la apariţia fenomenului invers, eliminarea de ioni K^+ şi încorporarea de protoni. O comportare similară celei observate la pH neutru o dovedesc şi probele urmărite la pH alcalin, dar fenomenul se atenuează în cazul probelor cu oleilamină.

Se constată deci aceeaşi alterare a membranei mitocondriale externe ca şi în cazul umflării pseudoenergetice, denotînd o permeabilitate crescută a acestei membrane pentru ionul K^+. Astfel, oleilamina determină o ieşire a ionilor K^+ la toate valorile de pH studiate, chiar şi în mediu alcalin, unde, normal, este greu să se elimine K^+ contra gradientului de concentraţie.

Alte cercetări [10], [12] au urmărit producerea radiosensibilizării celulelor prin alterarea unor funcţii mitocondriale, în acest scop fiind necesar să se utilizeze substanţe care să interfereze cu componentele membranei mitocondriale şi care, sub acţiunea iradierii, să inducă formarea de compuşi toxici pentru celulă. În acest fel s-ar putea încetini refacerea celulară ce urmează iradierii. Rezultatele utilizării oleilaminei ca radiosensibilizator sînt prezentate în alte două lucrări [20], [21].

CONCLUZII

Prezenţa *in vitro* a oleilaminei pare să inducă în mitocondrii unele perturbări dependente de metabolismul energetic al acestora, şi anume creşterea umflării pseudoenergetice, scăderea umflării energetice şi reducerea capacităţii de tamponare. Alterarea mecanismelor de permeabilitate implicate în transportul apei, al electroliţilor şi protonilor ar determina o fosforilare oxidativă decuplată.

Acest lucru ar putea avea o semnificaţie deosebită pentru celulă, întrucît se consideră [19] că ciclurile de umflare-contractare ale mitocondriilor ar reprezenta unul din mecanismele cibernetice care permit reglarea autonomă a respiraţiei şi fosforilării în celula intactă.

Prezentat la redacţie la 25 octombrie 1972

Institutul oncologic,
Sectorul de biologie moleculară,
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. H. Narte, Proc. Soc. exp. Biol. Med., **122**, 545 (1966).
2. P. Borst, J. A. Loos, E. J. Christ, E. C. Slater, Biochim. biophys. Acta., **62**, 509 (1962).
3. L. Wojtczak, H. Zaluska, Biochim. biophys. Acta, **189**, 455 (1969).
4. R. A. Harris, B. Farmer, T. Ozawa, Arch. Biochem. Biophys., **150**, 199 (1972).

5. G. Hogeboom, W. Schneider, G. Palade, J. biol. Chem., **172**, 619 (1948).
6. V. Gheție, V. Micușan, *Analiza imunochimică*, Edit. Academiei, București, 1966, p. 12.
7. G. Blondin, D. E. Green, Arch. Biochem. Biophys., **129**, 158 (1969).
8. G. Blondin, D. E. Green, Arch. Biochem. Biophys., **132**, 509 (1969).
9. D. D. Tyler, Biochem. J., **111**, 665 (1969).
10. G. Dinescu, C. Mihai, Rev. roum. Biochim., **9**, 35 (1972).
11. C. Rossi, E. Carafoli, *Membrane Models and the Formation of Biological Membranes*, ed. L. Bolis, B. A. Pethica, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1968, p. 264.
12. G. Dinescu, C. Mihai, Oncol. Radiol., **XI**, 241 (1972).
13. P. Björntorp, H. Allen Ells, R. Bradford, J. biol. Chem., **239**, 1334 (1964).
14. D. E. Green, H. Baum, *Energy and the Mitochondrion*, Acad. Press, New York, London, 1970.
15. D. D. Tyler, Biochem. J., **107**, 121 (1968).
16. J. Asai, G. Blondin, W. Vail, D. E. Green, Arch. Biochem. Biophys., **132**, 524 (1969).
17. D. E. Green, J. Asai, R. Harris, J. Penniston, Arch. Biochem. Biophys., **125**, 684 (1968).
18. R. Cereijo-Santaló, Canad. J. Biochem., **44**, 695 (1966).
19. A. L. Lehninger, *The Mitochondrion. Molecular Basis and Structure*, W. A. Benjamin, Inc., New York, 1965.
20. G. Dinescu, C. Mihai, Rev. roum. Biochim., **10**, 23 (1973).
21. G. Dinescu, C. Mihai, Oncol. Radiol., sub tipar.

ALTERATION OF SOME MITOCHONDRIAL FUNCTIONS UNDER THE ACTION *IN VITRO* OF OLEYLAMINE

SUMMARY

The influence of oleylamine upon some mitochondrial functions *in vitro*, was determined. For this purpose, the determinations were performed on rat liver mitochondria, and the following functional aspects of mitochondria were investigated: oxidative phosphorylation, pseudo-energized swelling, energized swelling, buffering capacity.

The results suggest that the presence of oleylamine *in vitro*, induces an alteration of these mitochondrial functions, due probably to a structural alteration.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 2, 153–159 (1973)

ACTIVITATEA IZOENZIMELOR LACTATDEHIDROGENAZEI M_4 ŞI H_4 PURIFICATE DIN MUŞCHI ŞI INIMĂ DE IEPURE ÎN PREZENŢA Na^+, K^+, Ca^{2+} ŞI Mg^{2+}

NATALIA MOLDOVEANU şi TR. BENŢIA

Rezumat. — S-a urmărit activitatea izoenzimelor lactatdehidrogenazei M_4 şi H_4 purificate din muşchi şi inimă de iepure în prezenţa ionilor de Na^+, K^+, Ca^{2+} şi Mg^{2+} la diferite concentraţii de substrat (piruvat de sodiu). Izoenzima din muşchi este uşor activată de ionii de K^+ şi uşor inhibată de ionii de Ca^{2+}, la o concentraţie de 100 mM şi la 25°C. După o incubare de 30 min la 37°C, la aceeaşi concentraţie de ioni, activitatea LDH—M_4 este uşor crescută în prezenţa ionilor de Na^+ şi uşor scăzută în prezenţa ionilor de Mg^{2+}, în timp ce activitatea LDH—H_4 nu suferă nici o modificare în prezenţa ionilor menţionaţi. Aceste constatări pot fi atribuite proceselor de desensibilizare, respectiv de sensibilizare la căldură a izoenzimei tip muşchi.

Este cunoscut rolul important ce revine ionilor în activitatea unor enzime [1], exercitînd efecte directe, locale, asupra centrilor enzimatici activi sau modificînd sarcina electrică a enzimei [2], [3]. În alte cazuri acţiunea lor se manifestă la nivelul unor procese multienzimatice, ca glicoliza şi respiraţia [4] , [5]. Printre ionii implicaţi în procesele metabolice se relevă importanţa ionilor de Na^+, K^+, Ca^{2+} şi Mg^{2+} [6].

Într-o lucrare recentă, Tănăsescu şi colab. [7], urmărind cinetica activării şi inhibării glicolizei de către ionii de K^+ şi Ca^{2+}, în prezenţa diferitelor substrate, au relevat activarea indusă de ionii de K^+ şi inhibiţia produsă de ionii de Ca^{2+}.

În lucrarea de faţă, care este o continuare a preocupărilor noastre anterioare legate de cinetica de reacţie a izoenzimelor LDH—M_4 şi H_4 [8], [9], am urmărit efectul determinat de ionii de Na^+, K^+, Ca^{2+} şi Mg^{2+} asupra activităţii izoenzimelor LDH—M_4 şi H_4 purificate din muşchi şi inimă de iepure.

MATERIAL ŞI METODE

Prepararea izoenzimelor. Izoenzimele lactatdehidrogenazei tip muşchi şi tip inimă au fost purificate din muşchi şi inimă de iepure, după metoda descrisă de Stolzenbach [10]. Izoenzimele LDH obţinute după precipitări repetate cu sulfat de amoniu au fost dializate faţă de o soluţie TRIS-HCl

0,04 M, pH 7,5, şi purificate prin trecere pe o coloană de DEAE-celuloză (Whatman DE 32).

Pentru izoenzima tip muşchi eluţia s-a efectuat cu soluţie TRIS-HCl 0,04 M, pH 7,5, iar pentru izoenzima LDH tip inimă s-a folosit un gradient liniar, cu o soluţie iniţială de TRIS-HCl 0,04 M şi NaCl 0,1 M. Izoenzimele pure obţinute au fost recristalizate cel puţin de două ori cu sulfat de amoniu şi apoi au fost păstrate la 3°C, în prezenţă a 1 mM 2-mercaptoetanol.

Puritatea izoenzimelor obţinute a fost controlată prin electroforeză în gel de poliacrilamidă sau agaroză în tampon TRIS-glicocol, pH 8,5, izoenzimele fiind evidenţiate după metoda lui Fine şi Costello [11].

Activitatea izoenzimelor LDH a fost determinată pe baza modificării extincţiei la 340 mμ [10]. Mediul de reacţie a constat din TRIS-HCl 100 mM, pH 7,5, NADH 0,125 mM, 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 şi 2 mM piruvat şi 6 μg enzimă. Volumul amestecului de reacţie a fost de 2 ml, iar temperatura de 25°C.

Activitatea izoenzimelor LDH tip muşchi şi tip inimă sub influenţa ionilor s-a urmărit în prezenţa a 10, 20 şi 100 mM NaCl, KCl, $CaCl_2$ sau $MgCl_2$.

O serie de determinări s-au efectuat imediat după adăugarea ionilor menţionaţi în mediul de reacţie, la 25°C, iar în alte variante experimentale după o incubare de 30 min la 37°C.

Concentraţia proteinei a fost determinată după metoda Lowry [15].

REZULTATE

Variantele experimentale urmărite în această lucrare au avut în vedere de a elucida în ce măsură ionii de Na^+, K^+, Ca^{2+} şi Mg^{2+} modifică activitatea izoenzimelor lactatdehidrogenazei tip muşchi şi tip inimă.

Primele determinări de activitate au fost urmărite în prezenţa a 10, 20 şi 50 mM NaCl, KCl, $CaCl_2$ şi $MgCl_2$. În aceste condiţii nu s-au constatat modificări ale activităţii izoenzimelor menţionate.

În cele ce urmează vom da rezultatele referitoare la activitatea lactatdehidrogenazei M_4 şi H_4 în prezenţa a 100 mM din ionii menţionaţi.

În prima variantă experimentală am urmărit efectul determinat de Na^+, K^+, Ca^{2+} şi Mg^{2+} asupra izoenzimei tip muşchi, activitatea LDH fiind urmărită imediat după adăugarea ionilor.

După cum reiese din figura 1, curbele de activitate a LDH-M_4 în absenţa ionilor sînt asemănătoare celor obţinute în prezenţa lor. S-a constatat doar o uşoară tendinţă de activare în prezenţa ionilor de K^+ şi o uşoară inhibare în prezenţa ionilor de Ca^{2+}.

În figura 2 este redată activitatea izoenzimelor tip inimă în prezenţa ionilor menţionaţi, adăugaţi imediat înainte de determinare, la 25°C.

După cum reiese din graficul prezentat, activitatea izoenzimei LDH-H_4 este inhibată de concentraţiile de substrat mai mari de 0,25 mM. Prin adăugarea Na^+, K^+, Ca^{2+} şi Mg^{2+}, aspectul curbei de saturare nu se schimbă, variaţiile activităţii izoenzimei LDH-H_4 în prezenţa acestor ioni fiind nesemnificative.

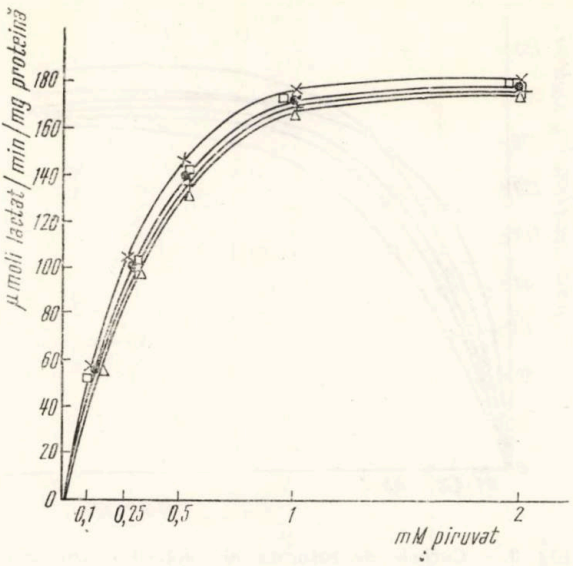


Fig. 1. — Activitatea izoenzimei LDH—M_4 în funcţie de concentraţia piruvatului, în absenţa sau prezenţa a 100 mM ioni de Na^+, K^+, Ca^{2+} şi Mg^{2+}, adăugaţi mediului de reacţie imediat înainte de determinare, la 25°C. Mediul de reacţie: TRIS—HCl 100 mM, pH 7,5; piruvat 0,1—2 mM; NADH 0,125 mM şi 6µg enzimă.
● = martor; + = NaCl; × = KCl; △ = $CaCl_2$; □ = $MgCl_2$.

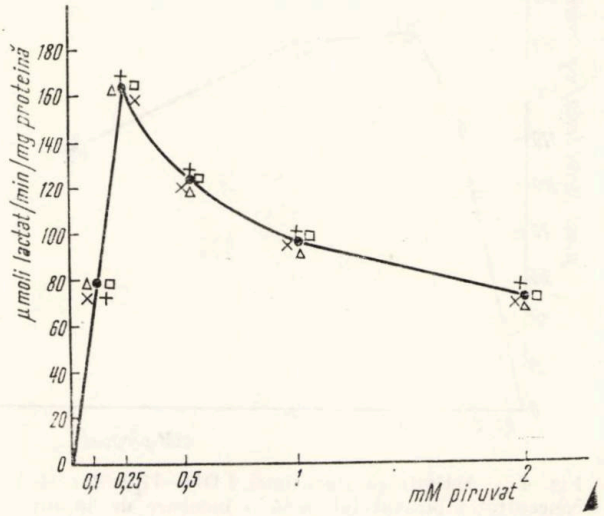


Fig. 2. — Activitatea izoenzimei LDH—H_4, în absenţa sau prezenţa a 100 mM Na^+, K^+, Ca^{2+} şi Mg^{2+}, în condiţii similare cu acelea date în figura 1.

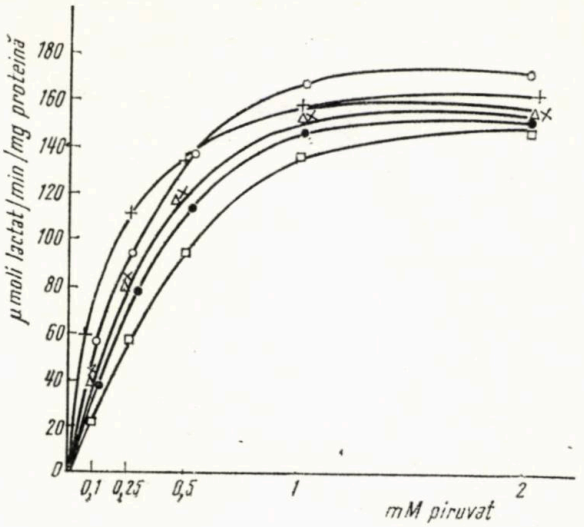


Fig. 3. — Curbele de saturare ale activității izoenzimei LDH—M_4 față de piruvat, după o incubare timp de 30 min la 37°C, în absența sau prezența ionilor de Na^+, K^+, Ca^{2+} și Mg^{2+}.

Mediul de reacție este dat în figura 1.

○ = martor neincubat; ● = martor incubat la 37°C; + = NaCl; × = KCl; △ = $CaCl_2$; □ = $MgCl_2$.

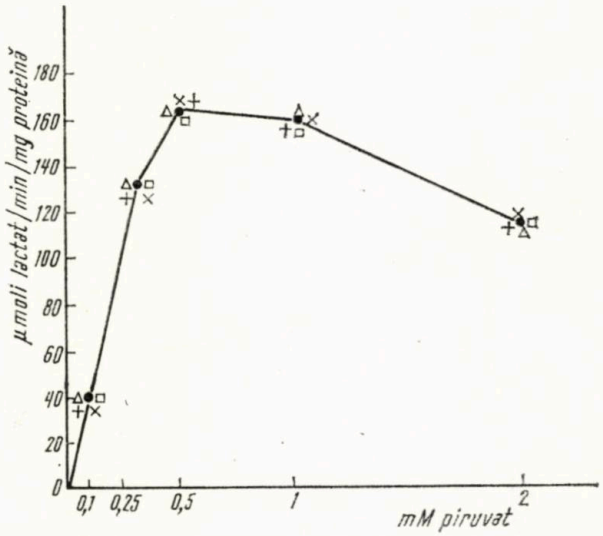


Fig. 4. — Activitatea izoenzimei LDH—H_4 în funcție de concentrația piruvatului după o incubare de 30 min la 37°C, în absența sau prezența ionilor de Na^+, K^+, Ca^{2+} și Mg^{2+}.

Explicația semnelor este dată în figura 3.

Pentru a vedea dacă activitatea izoenzimelor LDH-M_4 şi H_4 este influenţată de prezenţa ionilor de Na^+, K^+, Ca^{2+} şi Mg^{2+} după o expunere la o temperatură fiziologică, am incubat enzima cu ionii menţionaţi timp de 30 min la 37°C.

În aceste condiţii (fig. 3), curba de saturare a martorului este modificată după incubare, în sensul unei scăderi a activităţii enzimatice.

Efectele induse de ioni de asemenea sînt diferite faţă de efectele produse asupra enzimei neincubate. Se constată astfel că în prezenţa ionilor de Na^+, mai ales la concentraţii mici de piruvat, activitatea izoenzimei LDH-M_4 este mai mare faţă de a martorului incubat. Variaţii în acelaşi sens ale activităţii, dar într-o măsură mai mică, se constată şi în cazul ionilor de K^+ şi Ca^{2+}. În prezenţa ionilor de Mg^{2+} activitatea este mai scăzută decît a martorului.

Urmărind în condiţii similare (30 min la 37°C) comportarea izoenzimei LDH-H_4 (fig. 4), s-a constatat în primul rînd lipsa efectului inhibitor al substratului, observat la 25°C. Figura 4 ilustrează, în al doilea rînd, că activitatea izoenzimei incubate în prezenţa ionilor este asemănătoare aceleia incubate în absenţa lor.

DISCUŢII

Activitatea enzimelor glicolitice este influenţată de prezenţa în mediul de reacţie a diferiţilor ioni. Astfel, reacţia piruvatkinazei este inhibată de Ca^{2+} şi Na^+ şi activată de K^+ şi Mg^{2+} (4). Observaţii similare au fost făcute şi în cazul fosfofructokinazei [12].

Dintre numeroasele explicaţii date efectului produs de ioni asupra enzimelor, o amintim pe aceea a formării chelatelor între ioni şi nucleotide [13] şi ipoteza reglării activităţii glicolitice de către ionii metalici [6].

Concentraţia ionilor din mediul de reacţie, ca şi rolul antagonist al ionilor de K^+ şi Mg^{2+} cu acela al ionilor de Na^+ şi Ca^{2+}, care este reliefat în cazul a o serie de enzime glicolitice, nu au fost constatate decît într-o mică măsură în cazul activităţii izoenzimelor LDH.

Astfel, activitatea izoenzimelor LDH, în special aceea a izoenzimei tip inimă, s-a dovedit a fi puţin influenţată de prezenţa ionilor de Na^+, K^+, Ca^{2+} şi Mg^{2+} într-o concentraţie mai mică de 100 mM. Atît în determinările imediate efectuate la 25°C, cît şi după o incubare de 30 min la 37°C, activitatea LDH-H_4 nu este modificată de prezenţa ionilor în mediul de reacţie.

În privinţa izoenzimei tip muşchi, se constată o uşoară tendinţă de activare în prezenţa a 100 mM K^+ şi un uşor efect inhibitor produs de ionii de Ca^{2+}, în determinările imediate la 25°C.

Uşoara creştere a activităţii izoenzimei LDH-M_4 în prezenţa Na^+, după o incubare de 30 min la 37°C, nu poate fi explicată prin acţiunea exercitată de acest ion asupra glicolizei. Aceasta o atribuim efectului de protecţie parţială pe care Na^+ îl are asupra sensibilizării la căldură a izoenzimei tip muşchi. La temperaturi mai înalte (60°C) şi la concentraţii mai mari (0,5—2 M), efectul protector al NaCl a fost semnalat şi de alţi autori [14]. Efectul pe care-l determină Mg^{2+} asupra izoenzimei

tip muşchi, după o incubare de 30 min la 37°C, îl atribuim accentuării sensibilizării la căldură pe care acest ion o induce asupra izoenzimei LDH-M_4 [14].

CONCLUZII

— Activitatea izoenzimelor LDH tip inimă nu este afectată de prezenţa în mediul de reacţie a ionilor de Na^+, K^+, Ca^{2+} şi Mg^{2+} nici în determinările imediate efectuate la 25°C, nici după o incubare de 30 min la 37°C.

— Inhibiţia de substrat semnalată în cazul izoenzimei tip inimă la 25°C este practic anulată prin incubarea de 30 min la 37°C, atît în prezenţa, cît şi în absenţa ionilor.

— După o incubare de 30 min la 37°C, activitatea izoenzimei LDH-M_4 este mai crescută în prezenţa Na^+ decît în absenţa sa şi mai scăzută în prezenţa Mg^{2+}, efectele semnalate fiind atribuite proceselor de desensibilizare, respectiv de sensibilizare la căldură a izoenzimei.

Prezentat la redacţie la 20 ianuarie 1973

Institutul de biochimie,
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. S. A. Kuly, E. A. Noltmann, în *The Enzyme*, vol. **VI**, edit. P. D. Boyer, H. Lardy şi K. Myrbäck, Academic Press, New York, 1962, p. 3.
2. A. S. Milvan, M. Cohn, J. biol. Chem., **240**, 238 (1965).
3. A. S. Milvan, M. Cohn, J. biol. Chem., **241**, 1178 (1966).
4. F. L. Bigrave, Biochem. J., **101**, 480 (1966).
5. B. Chance, *Proc. Third Intern. Cong. Biochem., Bruxelles, 1955*, Academic Press, New York, 1956, p. 300.
6. F. L. Bigrave, Nature, **214**, 667 (1967).
7. D. Tănăsescu, Tr. Rădulescu, Tr. Benţia, Rev. roum. Biochim., **8**, 343 (1971).
8. D. Tănăsescu, N. Moldoveanu, C. Medeşan, Rev. roum. Biochim., **9**, 79 (1972).
9. N. Moldoveanu, D. Tănăsescu, Biochim. Biol. Sper., **X** (1972—1973) (sub tipar).
10. F. Stolzenbach, în *Methods in Enzymology*, vol. **9**, edit. M. W. Wood, Academic Press, New York, 1966, p. 278.
11. J. H. Fine, J. A. Costello, în *Methods in Enzymology* vol. **6**, edit. S. P. Colowik, N. O. Kaplan, Academic Press, New York, London, 1963, p. 958.
12. D. E. Atkinson, D. M. Walton, J. biol. Chem., **240**, 757 (1965).
13. K. S. Lee, Nature, **207**, 85 (1965).
14. C. L. Markett, E. J. Massaro, Arch. Biochem. Biophys., **115**, 417 (1966).
15. O. H. Lowry, N. J. Rosebroogh, L. A. Farr, R. J. Randall, J. biol. Chem., **193**, 265 (1951).

THE ACTIVITY OF M_4 AND H_4 LACTATEDEHYDROGENASE ISOENZYMES PURIFIED FROM MUSCLE AND RABBIT HEART, IN THE PRESENCE OF Na^+, K^+, Ca^{2+} AND Mg^{2+}

SUMMARY

The activity of M_4 and H_4-LDH isoenzymes purified from rabbit muscle and heart has been followed in the presence of Na^+, K^+, Ca^{2+}, or Mg^{2+}, at various substrate concentrations (Na pyruvate).

The muscle type isoenzyme is slightly activated by K^+ and slightly inhibited by Ca^{2+}, at 100 mM ion concentrations, at 25°C. After 30 min incubation at 37°C, at the same ion concentration, the M_4-LDH activity is slightly increased by Na^+ and slightly decreased by Mg^{2+}, while H_4-LDH is practically not influenced by the above mentioned ions.

These findings could be attributed to processes of heat desensitization respectively sensitization of muscle type isoenzyme.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 2, 161–169 (1973)

PREZENȚA DISULFID-REDUCTAZEI NUCLEOTID-DEPENDENTĂ ÎN FICATUL DE IEPURE

CECILIA MOTAȘ și CORINA SARMANIOTI

Rezumat. — S-a constatat că supernatantul de la 100 000 g al omogenatului de ficat de iepure conține o enzimă capabilă să reducă legăturile disulfidice ale unui substrat proteic, ca insulina, în prezența NADPH.

O primă concentrare a activității enzimatice s-a realizat prin precipitare cu $(NH_4)_2SO_4$, la 40–80% saturare, a supernatantului. Această enzimă brută este sensibilă la arsenit și la o încălzire de 30 min la 70°C.

Purificarea s-a făcut prin cromatografiere pe DEAE-celuloză și ulterior prin gel-filtrare, întrebuințîndu-se DTNB (acid 5,5′-ditiobis-2-nitrobenzoic) ca indicator disulfidic.

Reducerea grupărilor —SS— din substrate proteice, scăzută prin purificare, a crescut puternic prin adăugarea unui factor termostabil prezent în supernatantul obținut prin încălzirea la 70°C a enzimei brute.

S-a emis ipoteza că în cursul catabolizării gamaglobulinelor la nivel celular intervine o protein-reductază care reduce legăturile —SS— interlanț, fie în molecula intactă de IgG, ca primă etapă, fie în molecula de fragment Fab, în etapa următoare scindării cu enzimele proteolitice [1], [2]. S-a cercetat acțiunea unor sisteme cunoscute ca avînd activitate reductazică, ca acelea NADH-dependente din mitocondrii [3], reductaza din mazăre [4] și protein-reductaza insulinei [5], [6], asupra IgG și a fragmentelor Fab de iepure. Nu s-a obținut reducerea moleculelor de imunoglubulină cu aceste sisteme [7]. Disulfid-reductaza, NADPH-dependentă, semnalată de F. Tietze în ficatul de șobolan [8], [9], a fost capabilă să reducă gamaglobulina G de iepure [7]. Așa fiind, ne-am propus să studiem dacă acest tip de enzimă se găsește și în ficatul de iepure, organul omolog gamaglobulinei întrebuințate. Mersul general al separării a fost cel descris de F. Tietze [8], [9] pentru enzima din ficatul de șobolan.

MATERIAL ȘI METODE

Obținerea enzimei brute din fracțiunea „faza solubilă”. Fracțiunile subcelulare ale ficatului s-au separat prin centrifugare fracționată a omogenatului în 0,01 M TRIS- 0,25 M zaharoză, pH 7,5, după Goldberger și colab. [10]; supernatantul de la 100 000 g („faza solubilă”) a fost dializat intens pe tampon și precipitat cu $(NH_4)_2SO_4$ pentru a obține fracțiunea 40 — 80% saturare $(NH_4)_2SO_4$. Precipitatul s-a

reluat într-un volum redus de tampon 5 mM TRIS-HCl, pH 7,5, ce conţinea 1 mM EDTA, şi s-a dializat. Această fracţiune reprezintă enzima brută. Determinarea concentraţiei proteice s-a făcut prin citirea absorbţiei la 280 nm, iar pentru suspensii prin metoda Aldridge [11].

Obţinerea enzimei purificate. Purificarea enzimei brute s-a făcut prin cromatografie pe DEAE-celuloză. S-a întrebuinţat o coloană de 25/2,5 cm, încărcată cu schimbătorul de ioni, echilibrată cu tamponul TRIS menţionat mai sus. Proteina introdusă s-a irigat cu acest tampon la o viteză de 40 ml/h, pînă ce s-au colectat toate proteinele neadsorbite. S-a iniţiat apoi un gradient continuu prin introducerea unei soluţii 1 M de NaCl. După determinarea activităţii de reducere a acidului 5,5′-ditiobis-2-nitrobenzoic (DTNB), NADPH-dependentă, a fracţiunilor, fracţiunile active au fost adunate, precipitate cu $(NH_4)_2SO_4$ pînă la o concentraţie de 100 % şi purificate mai avansat prin gel-filtrare pe Sephadex G-100 în tampon TRIS-HCl, pH 8,0, 0,05 M, ce conţine 0,2 M NaCl, folosindu-se o coloană de 100/2,5 cm. S-au colectat fracţiuni de 5 ml. Fracţiunile au fost analizate pentru proteine şi pentru reducerea DTNB, NADPH-dependente. Fracţiunile care aveau activitate enzimatică au fost adunate, concentrate şi păstrate prin îngheţare în porţiuni mici la −20°C.

Obţinerea unui factor termostabil activator al enzimei purificate. Fracţiunea obţinută prin precipitarea cu $(NH_4)_2SO_4$ 40—80 % a fazei solubile (supernatantul microzomial), adică enzima brută, s-a încălzit la 70°C, timp de 20 min, şi s-a centrifugat. Supernatantul limpede s-a adus la saturare 100 % cu $(NH_4)_2SO_4$, la temperatura camerei, iar materialul precipitat s-a dizolvat într-un volum mic de tampon şi s-a dializat. Acesta reprezintă factorul brut. La rîndul său, factorul brut s-a încercat să se purifice prin trecere pe coloană de G-100, de 80/1,5 cm, irigată în acelaşi tampon TRIS-HCl. Fracţiunile au fost analizate pentru proteine şi pentru activitatea de cofactor în reducerea insulinei dependentă de NADPH.

Determinarea activităţii reductazei disulfidice nucleotid-dependente. Reducerea enzimatică a legăturilor disulfidice din proteine de către NADPH s-a urmărit la pH 7,5 în tampon TRIS-HCl 0,1 M, ce conţinea 5 mM EDTA, prin măsurarea formării grupărilor sulfhidril cu DTNB, metoda lui Ellman [11]. Amestecurile de reacţie care conţineau substratul proteic disulfidic, NADPH, şi extractul enzimatic, în proporţii variabile în funcţie de substrat, erau incubate aerob în eprubete cu dop, la 25°C. Determinările cu enzima purificată se făceau în amestecuri cu insulină ca substrat, NADPH şi factorul termostabil ca activator. La intervale de timp, părţi alicote din amestec se adăugau la 1 ml soluţie de DTNB (2,4 mg/ml) în 5 M guanidină hidroclorică în tampon TRIS de pH 8,0, ce conţinea 10 mM EDTA. Guanidina a fost inclusă în amestecul de reacţie pentru a asigura o solubilitate completă a componentelor proteice şi pentru a preveni reducerea enzimatică a DTNB, care este el însuşi un substrat disulfidic sensibil în reacţia studiată. Ca martori s-au făcut amestecuri de reacţie fără NADPH sau fără substratul disulfidic. Ca substrate disulfidice s-au întrebuinţat DTNB pentru decelarea activităţii reductazice în fracţiunile de la cromatografiere pe DEAE-celuloză şi de la gel-filtrare şi insulina pentru detectarea proprietăţii de activator a factorului termostabil şi pentru verificarea activităţii enzimei. Reacţia

de culoare s-a citit la Pulfrich, cu filtrul 420 nm (absorbţia maximă 412 nm a reactivului disulfidic redus), faţă de apă distilată. Rezultatele s-au exprimat în densitate optică DO, întocmindu-se cîte o curbă în fiecare situaţie dată şi trecîndu-se condiţiile exacte de lucru în legenda figurii.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Deoarece determinările efectuate pe diferite substrate nu au păstrat nici concentraţiile, nici proporţiile între componentele adăugate, variindu-se şi timpul de reacţie, nu s-au putut face comparaţii şi evaluări cantitative ale activităţii enzimatice în funcţie de gradul de purificare. Scopul nostru

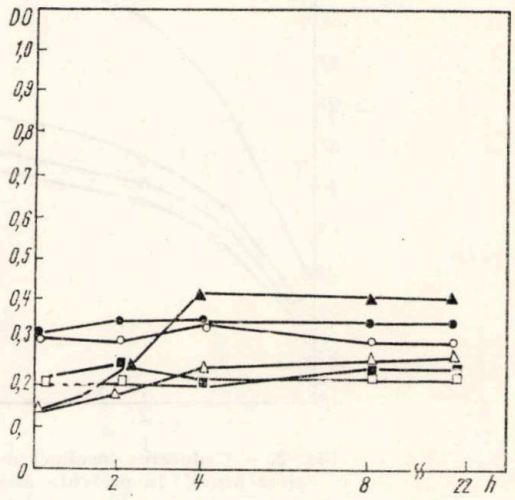


Fig. 1. — Reducerea insulinei de către NADPH în prezenţa fracţiunilor ficatului de iepure.

Amestecurile de reacţie (0,50 ml) conţin: insulină 2 mg, NADPH 1,0 μm şi respectiv suspensie de mitocondrii (2 mg proteină) în tampon TRIS, pH 7,5, suspensie de microzomi (2 mg proteină) şi supernatantul microzomial dializat (2 mg proteină). Sistemul complet (insulină, NADPH, extract) (simbol plin). Martorii respectivi: NADPH + extract (simbol gol).

●○ mitocondrii ■ □ microzomi ▲△ supernatant

nu a fost de a obţine o activitate maximă, ci de a purifica substanţial enzima, fie şi în detrimentul activităţii enzimatice, pentru a avea o concentraţie proteică minimă. Aceasta în vederea întrebuinţării ulterioare a altor metode de decelare a componentelor obţinute prin reducerea proteinelor (electroforeză, gel-filtrare, cromatografie în strat subţire etc.), în care proteina enzimei ar reprezenta un impediment.

Ca şi pe ficat de şobolan [8], iniţial s-a determinat prezenţa activităţii enzimatice care catalizează reducerea legăturii disulfidice a proteinelor prin NADPH pe fracţiunile subcelulare ale ficatului de iepure, întrebuinţîndu-se insulina ca substrat. S-a constatat că mitocondriile şi microzomii nu prezintă activitate. În schimb, faza solubilă (supernatantul de la 100 000 g, postmicrozomial) prezintă o lentă, dar netă activitate reductazică (fig. 1). Martorul fără NADPH, adică supernatantul şi insulina, nu se modifică în timp, în schimb martorul fără substratul disulfidic, adică supernatantul în prezenţa NADPH, se modifică în timp. Supernatantul conţine şi activităţi de glutation-reductază şi GSH-disulfid-transhidrogenază (8), care vor da acest martor crescut pe substrate disulfidice endogene, formînd reducerea „bazală" din lucrarea menţionată

(8). Valoarea reală a activităţii enzimatice se va exprima prin scăderea DO a martorului din aceea a probei.

O primă concentrare a activităţii enzimatice s-a făcut prin precipitare cu $(NH_4)_2SO_4$ la 40—80 % saturare a fazei solubile. Fracţiunea reluată într-un volum redus şi dializată reprezintă enzima brută. Activitatea reductazică, întrebuinţînd insulina ca substrat, se concentrează în această fracţiune (fig. 2). Dar cum odată cu enzima cercetată se concentrează în aceeaşi fracţiune şi sistemele cuplate, glutation—glutation-reduc-

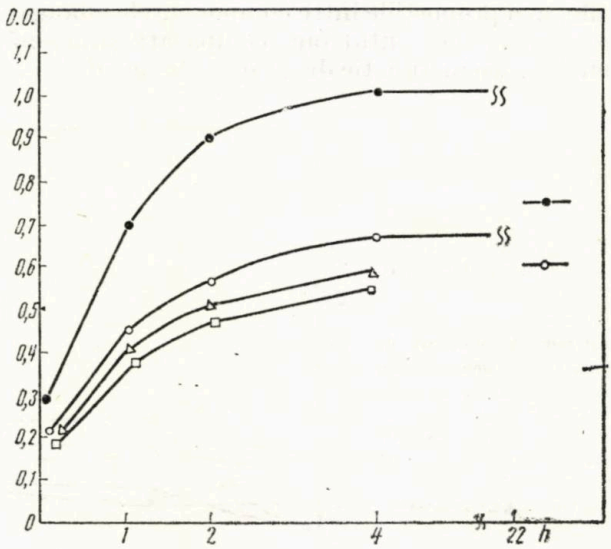


Fig. 2. — Reducerea insulinei de către NADPH cu „enzima brută" în prezenţa arsenitului şi a căldurii.

Amestecul de reacţie (0,50 ml) conţine:
insulină 2 mg, NADPH 2,0 µm şi 1,5 mg din fracţiunea precipitată cu 40—80 % $(NH_4)_2SO_4$

● Sistemul complet. ○ Martorul sistemului complet: fracţiunea precipitată cu 40—80 % $(NH_4)_2$ SO_4 şi NADPH 2,0 µm minus insulină. △ Sistemul complet + arsenit 10^{-4} M. □ Sistemul complet cu enzima brută încălzită la 70°C timp de 30 min.

tază şi glutation—disulfid-transhidrogenază [9], va apărea şi aici un martor crescut, trecut în figură şi format din 1) fracţiunea precipitată cu 40—80 % $(NH_4)_2SO_4$ şi NADPH. Ceilalţi martori formaţi din 2) insulină cu NADPH şi 3) insulină cu fracţiunea precipitată cu 40—80 % $(NH_4)_2SO_4$ nu dau valori crescute şi nu au mai fost trecuţi în figura 2.

Concentraţia proteică a enzimei necesară unei decelări sesizabile a reducerii unui substrat proteic prin alte metode este încă mult prea mare. Înainte de a trece la o purificare mai avansată a enzimei, se impunea controlul asemănării dintre enzimele din ficatul de şobolan şi de iepure, luîndu-se în vedere parametrii stabiliţi de Tietze [9], şi anume sensibilitatea la arsenit şi stabilitatea la căldură. În consecinţă, am determinat activitatea reductazică a enzimei brute în prezenţa arsenitului de sodiu (10^{-4} M), ştiut fiind că reductaza NADPH-dependentă este foarte sensibilă

la acest component [9]. Se poate elimina astfel şi eventuala presupunere că reducerea insulinei s-ar datora prezenţei în preparat a sistemului glutation—glutation-reductază, rezistent la acţiunea arsenitului [9]. Rezultatele din figura 2 indică o inhibiţie totală a activităţii reductazice a

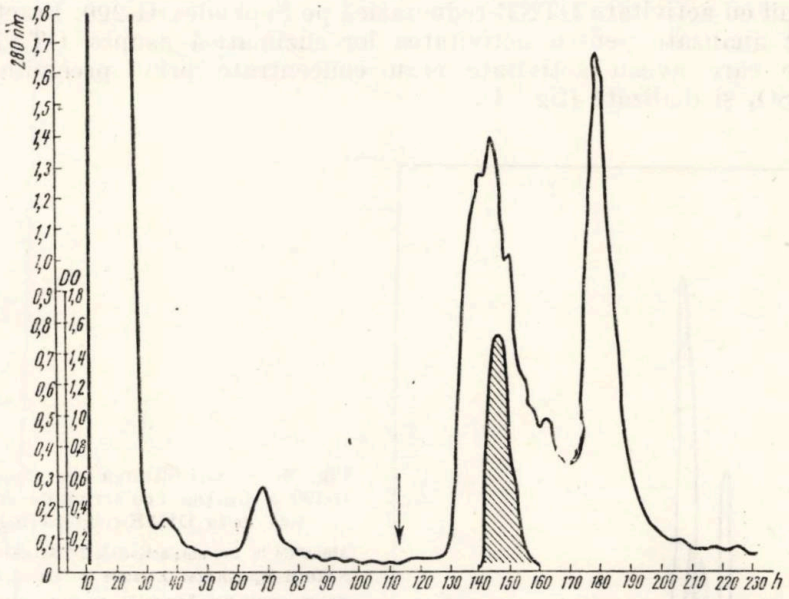


Fig. 3. — Cromatografia pe DEAE-celuloză a fracţiunii precipitate cu 40—80% $(NH_4)_2SO_4$ a supernatantului microzomial (mg).

Iniţierea gradientului de NaCl este indicată de săgeată. Absorbţie la 280 nm; activitate DTNB-reductazică NADPH-dependentă. Eluatele cu activitate enzimatică (porţiunea haşurată) au fost concentrate prin precipitare cu $(NH_4)_2SO_4$ şi precipitatul dializat faţă de tampon TRIS-EDTA.

enzimei brute în prezenţa arsenitului, evidenţiind un sistem reductazic sensibil la arsenit, independent de glutation-reductază.

Un alt mod de deosebire a celor două sisteme reductazice este diferenţa de comportare la căldură. O încălzire de 30 min la 70°C a enzimei brute este fără efect asupra glutation-reductazei, dar inactivează total activitatea pe substratul insulină în prezenţa NADPH (fig. 2).

Din cauza prezenţei sistemelor reductazice rezistente la acţiunea arsenitului şi a căldurii în fracţiunea precipitată cu 40—80% $(NH_4)_2SO_4$, inhibiţia nu pare totală, deoarece rezultatele sînt aduse la nivelul martorului. Activitatea lentă observată este datorită acestor două sisteme, sistemul protein-reductazic NADPH-dependent fiind abolit complet.

Ca şi pentru ficatul de şobolan [9], comportarea sistemului reductazic NADPH-dependent din ficatul de iepure, în prezenţa arsenitului şi a căldurii, defineşte existenţa lui independentă de aceea a glutation-reductazei.

Purificarea activităţii enzimatice s-a continuat prin cromatografierea enzimei brute pe DEAE-celuloză, cu iniţierea unui gradient continuu de NaCl. Fracţiunile au fost analizate pentru activitatea DTNB-reductazică (fig. 3). Eluatele care aveau activitate erau concentrate prin preci-

pitare cu $(NH_4)_2SO_4$ şi dializate faţă de tampon TRIS-EDTA. DTNB s-a întrebuinţat ca un substrat disulfidic în separările cromatografice ale activităţii reducătoare NADPH-dependente, din cauza sensibilităţii ca indicator şi a uşurinţei de determinare.

Purificarea mai avansată a enzimei s-a continuat prin gel-filtrarea fracţiunii cu activitate DTNB-reductazică pe Sephadex G-200. Fracţiunile au fost analizate pentru activitatea lor enzimatică asupra DTNB, iar eluatele care aveau activitate erau concentrate prin precipitare cu $(NH_4)_2SO_4$ şi dializate (fig. 4).

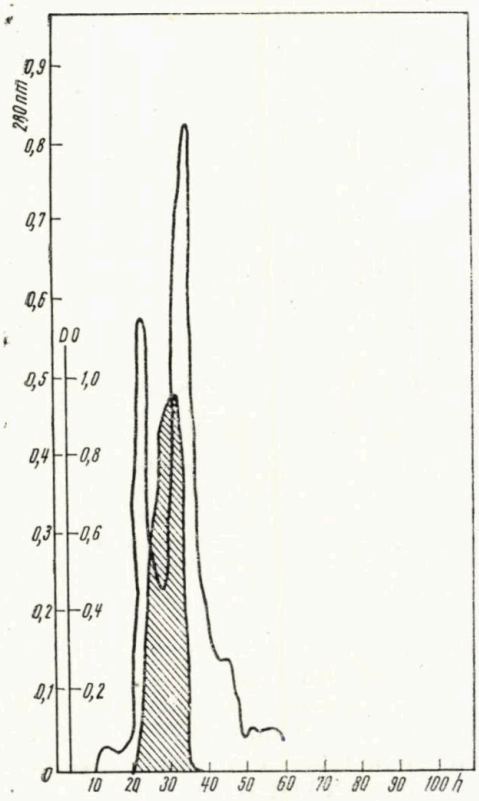


Fig. 4. — Gel-filtrarea pe Sephadex G-100 a fracţiunii cu activitate enzimatică de la DEAE-celuloză (mg).

Absorbţie la 280 nm; activitate DTNB-reductazică NADPH-dependentă. Eluatele cu activitate enzimatică (porţiunea haşurată) au fost concentrate prin precipitare cu $(NH_4)_2SO_4$ şi precipitatul dializat faţă de tampon TRIS – EDTA.

Purificarea prin cele două etape, cromatografierea şi gel-filtrarea, reuşeşte să crească activitatea DTNB-reductazică, NADPH-dependentă.

Pentru a determina dacă piscurile cu activitate reductazică pentru DTNB reprezentau activitatea reductazică NADPH-dependentă, mult mai generală, a fazei solubile întregi, pe substrate proteice, s-au făcut determinări şi pe un substrat proteic ca insulina. S-a constatat că şi activitatea protein-reductazică este localizată pe aceleaşi fracţiuni.

Deşi s-au anticipat creşteri substanţiale ale activităţii enzimatice prin procedeele de purificare, ca şi în cazul ficatului de şobolan, dimpotrivă, s-au găsit activităţi insulin-reductazice scăzute (tabela 1).

În aceste condiţii am apelat la existenţa factorului termostabil, necesar activităţii enzimei din ficatul de şobolan [9]. În adevăr, activitatea insulin-reductazică a preparatelor purificate prin cromatografiere şi gel-filtrare a crescut considerabil prin adăugarea unei cantităţi reduse

Tabela 1

Activităţile disulfid-reductazei NADPH-dependente a fracţiunilor brute şi purificate din supernatantul microzomial pe insulină ca substrat (2 mg), după 2 ore

Experienţa	Fracţiunea	Activator	Activitatea specifică DO/mg proteină
1	Supernatant microzomial (2 mg)	—	0,10
2	Enzimă brută (1,5 mg)	—	0,25
3	Fracţiunea cu activitate enzimatică de la Sephadex G-100 (0,12 mg)	—	0,10
4	Fracţiunea cu activitate enzimatică de la Sephadex G-100 (0,12 mg)	1,2 mg	7,4

din factorul termostabil (tabela 1). Creşterea activităţii enzimei prin purificare şi prin prezenţa factorului activator este dată în tabela 1.

Pentru tabela 1, s-au ales acele rezultate exprimate în DO care sînt obţinute la 2 ore de acţiune a enzimei asupra substratului şi care au fost exprimate în activitatea specifică pe mg de proteine.

Curba reducerii insulinei cu enzima purificată în prezenţa activatorului este dată în figura 5.

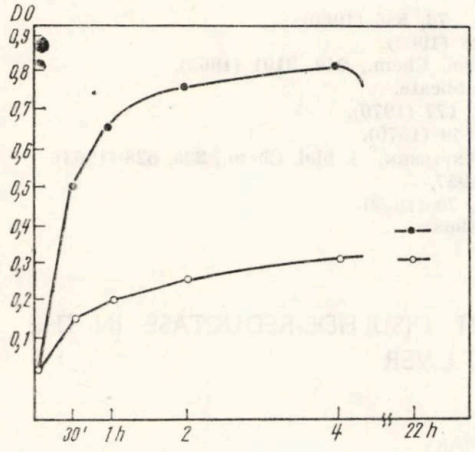


Fig. 5. — Reducerea insulinei cu preparatul enzimatic purificat, în prezenţa activatorului.

(2 mg insulină, 0,12 mg enzimă, 1,2 mg activator şi 2 mg NADPH) şi martorul cu aceleaşi componente, minus insulina.

● sistemul complet.
○ martor.

În ceea ce priveşte activatorul, acesta nu s-a putut purifica prin trecere pe G-100, cum este indicat pentru enzima din ficatul de şobolan [9]. Curba absorbţiei la 280 nm are cu totul alt profil la ficatul de iepure

şi nu am putut decela în eluatele obţinute repartizarea proprietăţii de activator al reacţiei de reducere a insulinei.

În felul acesta, activatorul întrebuinţat este în stare parţial purificată şi reacţia de reducere necesită o cantitate destul de apreciabilă (1,2 mg) faţă de cantitatea de 10 ori mai mică a enzimei (0,12 mg).

Rolul sistemului reductazic NADPH-dependent în metabolismul celular este încă necunoscut, presupunîndu-se o asemănare cu sistemul tioredoxin—tioredoxin-reductază prezent în E. coli [12]. Se întrevede posibilitatea intervenţiei lui în unele etape de degradare a proteinelor la nivel celular [1].

În concluzie s-a separat şi purificat o enzimă NADPH-dependentă capabilă să desfacă legăturile disulfidice dintr-un component sensibil ca DTNB.

Pentru reducerea unei proteine complexe ca insulina este necesară prezenţa ca activator a unui factor termostabil.

Sistemul enzimatic este independent de sistemul glutation—glutation-oxidază şi de glutation—disulfid-transhidrogenaza, fiind prezent însă în acelaşi component celular — citoplasma solubilă.

Prezentat la redacţie la 14 noiembrie 1972

Institutul de biochimie
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. V. Gheţie, Cecilia Motaş, Immunochemistry, **8**, 1021 (1971).
2. V. Gheţie, Microbiologia, Parazitologia, Epidemiologia, **17** (1972).
3. S. Skhede, Biochem. J., **103**, 693 (1968).
4. M. D. Hatch, J. F. Turner, Biochem. J., **76**, 556 (1960).
5. H. H. Tomizawa, J. biol. Chem., **237**, 428 (1962).
6. H. H. Tomizawa, P. T. Varandani, J. biol. Chem., **240**, 3191 (1965).
7. V. Gheţie, Cecilia Motaş, rezultate nepublicate.
8. F. Tietze, Arch. Biochem. Biophys., **138**, 177 (1970).
9. F. Tietze, Biochim. biophys. Acta, **229**, 149 (1970).
10. R. F. Goldberger, C. J. Epstein, C. B. Anfinsen, J. biol. Chem., **238**, 628 (1963).
11. W. N. Aldridge, Biochem. J., **67**, 423, 1957.
12. G. Ellman, Arch. Biochem. Biophys., **82**, 70 (1959).
13. P. Reichard, Eur. J. Biochem., **3**, 259 (1968).

PRESENCE OF NADPH-DEPENDENT DISULFIDE-REDUCTASE IN THE RABBIT LIVER

SUMMARY

In the 100.000 g supernatant fraction of rabbit liver homogenate, an enzyme able to promote the reduction of the disulfide bonds of a proteic substrate as insuline in the NADPH presence was found.

An initial concentration of the enzymatic activity was carried out by precipitation of the supernatant with $(NH_4)_2SO_4$ at 40—80 % saturation. This "crude-enzime" is susceptible to arsenite and to heat treatment at 70°C for 30 min.

The purification was achieved by chromatography on DEAE-cellulose and further by gel filtration on Sephadex G-200 using 5,5′-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) as indicator disulfide.

The reduction of —SS— groups from the proteic substrates, decreased by purification, was greatly increased by adding a heat-stable component existing in the supernatant obtained by heating to 70°C of the „crude enzime".

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 2, 171–173 (1973)

CONTRIBUȚII LA BIOSINTEZA CAROTENOIDELOR. VI. BIOSINTEZA CAROTENOIDELOR DIN *ESCHSCHOLTZIA CALIFORNICA*

GAVRIL NEAMȚU și CORNEL BODEA

Rezumat. — S-au determinat carotenoidele din frunze de *Eschscholtzia californica*, colectate în diferite perioade, din mugurii florali în diferite stadii de dezvoltare și din flori de diferite culori.

Varietățile cu flori portocalii sînt mai bogate în carotenoide decît cele cu flori galbene. Eschscholtxantina, care are sistem polienic retro, se găsește numai în mugurii florali și în flori, nu și în frunze.

Se propune o schemă a biosintezei pigmenților carotenoidici din florile portocalii de *Eschscholtzia californica*.

În cadrul cercetărilor noastre privind dinamica biosintezei pigmenților carotenoidici la plantele superioare ne-am ocupat, în continuare, de cercetarea carotenoidelor din frunzele, mugurii florali și florile de *Eschscholtzia californica*, organe care pînă în prezent nu au fost examinate sub acest aspect. Existența unor carotenoide în florile acestei specii a fost semnalată anterior [1], [2], [3].

Eschscholtzia californica este o plantă ierboasă, cu flori galben-portocalii, înaltă de 40—50 cm, originară din America de Nord, unde crește spontan, mai cu seamă în California. În țara noastră se cultivă în grădinile botanice, ca plantă ornamentală. Din 1964 noi o cultivăm în Grădina botanică a Institutului agronomic „Dr. Petru Groza" din Cluj, unde s-a aclimatizat cu ușurință. Are o perioadă lungă de înflorire, de la începutul lunii mai și pînă la sfîrșitul lunii octombrie, ceea ce reprezintă un mare avantaj pentru obținerea unor cantități mari de flori.

Sub aspectul pigmenților carotenoidici, *Eschscholtzia californica* prezintă importanță deosebită, prin faptul că este singura plantă cunoscută pînă în prezent care conține în flori eschscholtxantină (4,5′-retro-β, β-caroten-3,3′-diol), pigment ce face parte dintre puținele carotenoide naturale care au în moleculă un sistem polienic retro [4], [5]. Faptul că eschscholtxantina se găsește în flori alături de carotenoide cu sistem polienic normal prezintă interes sub aspectul cunoașterii biosintezei pigmenților carotenoidici florali. Este importantă, de asemenea, stabilirea locului inițial de formare a eschscholtxantinei și a raportului dintre carotenoide în timpul creșterii și dezvoltării plantei.

În lucrarea de față se prezintă pigmenții carotenoidici din frunzele de *Eschscholtzia californica*, recoltate la diferite intervale de timp, din

mugurii florali aflați în trei faze de dezvoltare și din flori cu colorit floral diferit.

MATERIAL ȘI METODE

Pentru cercetarea pigmenților carotenoidici din *Eschscholtzia californica* s-a folosit material proaspăt (frunze, muguri florali, flori), obținut din Grădina botanică a Institutului agronomic „Dr. Petru Groza" din Cluj, în perioada 1965—1972.

Extragerea carotenoidelor s-a făcut cu amestec de eter de petrol-acetonă-metanol, în raport de 6 :3 :1. Pentru separarea și purificarea carotenoidelor s-a folosit cromatografia pe coloană, utilizînd ca adsorbant amestec de oxid de magneziu cu nisip fin. Developarea coloanelor adsorbante s-a făcut cu amestec de eter de petrol și benzen pînă la 50%. Pentru verificarea purității pigmenților și pentru cromatograme de amestec s-a folosit și cromatografia în strat subțire, întrebuințînd ca adsorbant numai oxid de magneziu, iar ca developant amestec de eter de petrol-acetonă-metanol, în raport de 8 : 1 : 1.

Saponificarea, identificarea și determinarea pigmenților carotenoidici s-au făcut prin aceleași metode ca și în lucrările anterioare [6], [7].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Conținutul pigmenților carotenoidici din frunzele recoltate la diferite intervale de timp se prezintă în tabela 1.

Tabela 1

Conținutul de carotenoide din frunzele de *Escholtzia californica* (în mg/100 g frunze proaspete)

Carotenoide	Vîrsta frunzelor (zile)					
	1—2	30	60	90	120	150
β-Carotină	0,46	0,85	1,42	1,26	0,94	0,75
Criptoxantină	0,03	0,09	0,14	0,20	0,27	0,32
Luteină	0,87	0,94	1,26	1,41	1,76	2,10
Zeaxantină	0,08	0,14	0,22	0,18	0,12	0,07
Violaxantină	0,32	0,39	0,48	0,40	0,35	0,27
Neoxantină	0,27	0,19	0,07	urme	—	—

Din determinările efectuate reiese că, odată cu creșterea și îmbătrînirea frunzelor, se produc schimbări în ce privește conținutul și raportul dintre carotenoide. În timp ce conținutul criptoxantinei și luteinei se mărește treptat odată cu creșterea și îmbătrînirea frunzelor, conținutul β-carotinei, zeaxantinei și violaxantinei se mărește numai în frunzele în creștere, pînă la 60 de zile, apoi începe să scadă. Neoxantina este singura carotenoidă foliară al cărei conținut se micșorează odată cu creșterea și îmbătrînirea frunzelor, nepunîndu-se în evidență în frunzele de 120 și 150 de zile.

În frunze se găsesc numai carotenoide cu structură α- şi β-iononică, cu sistem polienic normal. Nu s-au identificat carotenoide cu sistem polienic retro.

Pentru a putea urmări dinamica biosintezei carotenoidelor florale şi corelaţia dintre carotenoide, s-au determinat pigmenţii carotenoidici şi din mugurii florali aflaţi în trei faze de dezvoltare. Determinările cantitative se prezintă în tabela 2.

Tabela 2

Conţinutul de carotenoide din mugurii florali de *Eschscholtzia californica* în diferite faze de dezvoltare (în mg/100 g material proaspăt)

Carotenoide	Muguri nedezvoltaţi, de 4—5 zile	Muguri dezvoltaţi, de 10—12 zile	Muguri înainte de înflorire, de 18—20 zile
I. Carotenoide cu sistem polienic normal			
a. Cu structură α-iononică			
Luteină liberă	2,27	2,08	1,65
Luteină ester	0,30	0,94	1,80
Flavoxantină ester	—	0,12	0,18
Subtotal	2,57	3,14	3,63
b. Cu structură β-iononică			
β-Carotina	1,60	1,40	1,30
Criptoxantina ester	0,10	0,14	0,20
Zeaxantina ester	0,08	0,17	0,28
Criptoxantină liberă	0,06	0,04	urme
Zeaxantină (liberă)	0,27	0,40	0,70
Violaxantină	0,70	0,64	0,52
Neoxantină	0,20	0,13	urme
Subtotal	3,01	2,92	3,00
c. Cu structură pseudociclică şi aciclică			
γ-Carotina	—	urme	0,06
Licopina	—	urme	0,25
Subtotal	—	—	0,31
II. Cu sistem polienic retro			
Eschscholtxantină ester (trans)	0,16	0,52	1,34
Eschscholtxantină ester (cis)	—	urme	0,23
Subtotal	0,16	0,52	1,57
Total carotenoide	5,74	6,58	8,51

În mugurii florali se găsesc un număr relativ mare de carotenoide. Dintre pigmenţii carotenoidici neidentificaţi în frunze, dar care se găsesc în mugurii florali aflaţi în diferite faze de dezvoltare, menţionăm eschscholtxantina ester, flavoxantina ester, γ-carotina şi licopina. Eschscholtxantina, care prezintă sistem polienic retro, apare la această specie mai întîi în mugurii florali nedezvoltaţi. Conţinutul acestui pigment se măreşte substanţial odată cu creşterea şi dezvoltarea mugurilor florali.

Spre deosebire de frunze, xantofilele din mugurii florali (luteina, criptoxantina, zeaxantina) apar atît în stare liberă, cît şi sub formă de ester.

Dacă urmărim raportul cantitativ dintre carotenoide în mugurii florali, constatăm că conținutul tuturor xantofilelor esterificate se mărește odată cu creșterea și dezvoltarea mugurilor florali. La fel se comportă zeaxantina (liberă), γ-carotina și licopina. Conținutul celorlalte carotenoide, cum sînt β-carotina, luteina, criptoxantina, violaxantina și neoxantina, se micșorează concomitent cu creșterea și dezvoltarea mugurilor florali.

Toate carotenoidele foliare s-au identificat și în mugurii florali. Cu excepția zeaxantinei, conținutul carotenoidelor foliare se micșorează pe măsură ce mugurii florali se dezvoltă. Creșterea conținutului zeaxantinei se poate înfăptui pe seama β-carotinei, criptoxantinei, violaxantinei și neoxantinei, care prin reacții de oxido-reducere se pot transforma cu ușurință în zeaxantină, deoarece toate aceste carotenoide au structură β-iononică [8], [9], [10], [11].

Zeaxantina și, prin ea, o parte din celelalte carotenoide foliare și din mugurii florali pot contribui la formarea eschscholtxantinei.

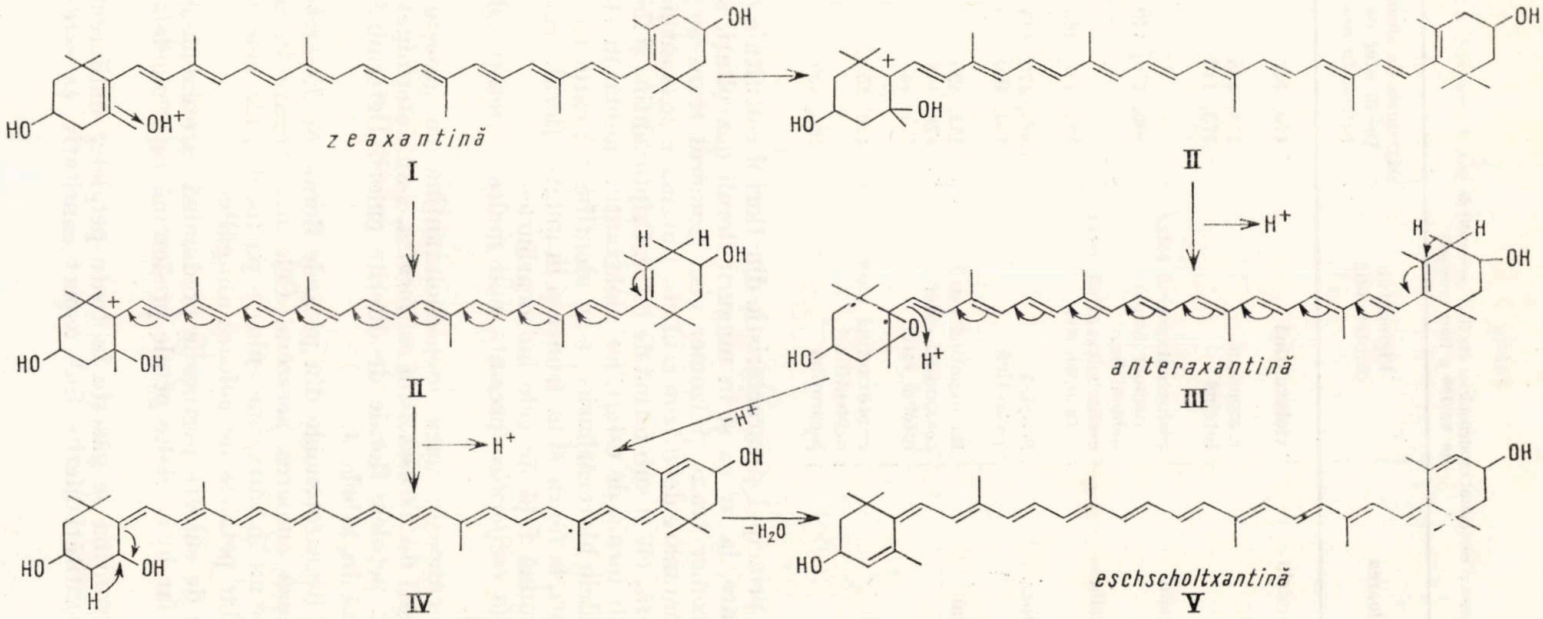
Pentru transformarea zeaxantinei în eschscholtxantină trebuie să se producă o dehidrogenare la carbonii C_4 și $C_{4'}$ din molecula zeaxantinei și să se schimbe poziția dublelor legături conjugate. Sub un control enzimatic la nivelul cloroplastelor sau cromoplastelor, transformarea zeaxantinei în eschscholtxantină se poate realiza cu ușurință. *In vitro*, prin acțiunea N,N'-diclorureei asupra fizalienului (diester de zeaxantină), am obținut eschscholtxantina ester [12]. Dacă acționăm cu N,N'-diclorureea asupra zeaxantinei, obținem anhidroeschscholtxantină [12]. În acest caz eschscholtxantina apare numai ca produs intermediar, deoarece, imediat ce se formează, suferă o deshidratare catalizată de ionii de hidrogen și se transformă în anhidroeschscholtxantină [12], [13], [14].

Prin experiențe cu izotopi radioactivi (^{14}C, $^{3}H_1$) s-a pus ulterior în evidență transformarea zeaxantinei, în petalele de *Eschscholtzia californica*, în eschscholtxantină [15], [16]. Mecanismul propus pentru această transformare se prezintă în schema 1.

După cum rezultă din această schemă, prin atacul grupării OH^+ la C_4 al zeaxantinei (I) se formează un carbocation (II) care pierde cu ușurință un proton de la $C_{4'}$ și dă naștere unui produs intermediar cu sistem polienic retro (IV). Acesta, prin eliminarea unei molecule de apă de la C_3 și C_4, formează eschscholtxantina (V). Carbocationul (II) alternativ, prin eliminarea unui proton de la gruparea OH atașată de C_5, poate să se transforme în anteraxantină (III), din care de asemenea prin eliminarea unui proton de la $C_{4'}$ se poate obține eschscholtxantina, tot prin intermediul produsului IV.

Din determinările efectuate putem constata că locul primar de formare a eschscholtxantinei îl constituie mugurii florali nedezvoltați, și nu florile. În trecut, prezența eschscholtxantinei era semnalată numai la nivelul florilor [1], [2], [3]. Pe măsură ce mugurii florali se dezvoltă, conținutul pigmenților carotenoidici crește. Acest aspect ne demonstrează că la nivelul mugurilor florali se produc intense procese de carotenogeneză.

Partea cea mai bogată în carotenoide o constituie la *Eschscholtzia californica* florile. Determinarea carotenoidelor din flori de culoare portocalie se prezintă în tabela 3.



Schema 1. — Transformarea zeaxantinei în eschscholtxantină în petalele de *Eschscholtzia californica*.

Tabela 3

Cromatograma și conținutul carotenoidelor din flori portocalii de *Eschscholtzia californica* (în mg/100 g flori proaspete)

Lățimea zonei în cm	Culoarea	Pigmentul carotenoidic	Maximele de absorbție în eter de petrol, în nm	Cantitatea în mg/100 g
0,4	galben-cărămiziu	violaxantină	470, 442	0,48
0,5	interzonă			
0,7	portocaliu	zeaxantină	478, 448	0,90
1,0	galben	luteină	473, 443	1,10
1,0	interzonă			
2,0	roșu-portocaliu	eschscholtxantină ester (izomer trans)	500, 470, 440	1,70
0,4	galben	neidentificat		
0,8	roșu-portocaliu	eschscholtxantină ester (izomer cis)	498, 467, 368	0,50
1,2	interzonă			
0,5	portocaliu-roz	licopină	503, 470, 443	0,40
0,2	portocaliu	γ-carotină	490, 460	0,20
1,0	interzonă			
0,9	galben-verzui	flavoxantină ester	452, 420	0,55
0,6	portocaliu	zeaxantină ester	478, 448	0,60
2,0	galben	luteină ester	473, 443	1,54
0,5	interzonă			
0,2	portocaliu	criptoxantină ester	480, 450	0,25
0,5	galben	neidentificat		
1,6	portocaliu	β-carotină	480, 450	1,20

Pigmentul principal și caracteristic din flori îl constituie eschscholtxantina ester, care, la fel ca și în mugurii florali dezvoltați, se prezintă sub formă de izomer trans și izomer cis. Izomerul trans se găsește în cantitate mult mai mare decît izomerul cis. Luteina și zeaxantina se găsesc atît în stare liberă, cît și sub formă de ester. Criptoxantina și flavoxantina se află numai sub formă de esteri, iar violaxantina numai în stare liberă. Dintre carotenoidele hidrocarburice, s-au identificat β-carotina, γ-carotina și licopina. În flori, la fel ca și în frunze și în muguri florali, carotenoidele oxigenate predomină față de cele hidrocarburice.

Eschscholtzia californica prezintă mai multe varietăți sub aspectul coloritului floral.

Pentru a cunoaște dacă eschscholtxantina se găsește în florile diferitelor varietăți de *Eschscholtzia californica*, s-au determinat pigmenții carotenoidici din petalele florale de diferite culori. Determinările cantitative se prezintă în tabela 4.

Conținutul de carotenoide din petalele florale de *Eschscholtzia californica* influențează culoarea acestora. Cele mai bogate în carotenoide sînt petalele care au în întregime culoare portocalie, iar cele mai sărace în carotenoide sînt petalele de culoare alb-gălbuie.

În petalele de culoare portocalie predomină carotenoidele cu structură β-iononică, iar în celelalte petale predomină carotenoidele cu structură α-iononică.

Eschscholtxantina se găsește în toate petalele, indiferent de coloritul lor, dar în cantități diferite. Sub aspect cantitativ, ea este pigmentul

Tabela 4

Conținutul de carotenoide din petalele florale de *Eschscholtzia californica*, de diferite culori (în mg/100 g flori proaspete)

Carotenoide	Petale florale de culoare			
	portocalie	portocalie cu pete galbene	galbenă	alb-gălbuie
I. Carotenoide cu sistem polienic normal				
a. Cu structură α-iononică				
Luteină	0,96	1,26	1,42	0,26
Luteină ester	1,20	1,29	1,63	0,37
Flavoxantină ester	0,32	0,38	0,54	urme
Subtotal	2,48	2,93	3,59	0,63
b. Cu structură β-iononică				
β-Carotină	1,15	0,92	0,74	0,38
Criptoxantină ester	0,27	0,21	0,11	0,38
Zeaxantină ester	0,72	0,58	0,24	0,03
Zeaxantină (liberă)	0,95	0,78	0,22	—
Violaxantină	0,43	0,49	0,57	0,10
Subtotal	3,52	2,98	1,88	0,51
c. Cu structură pseudociclică și aciclică				
γ-Carotină	0,26	0,20	urme	—
Licopină	0,47	0,36	0,08	—
Subtotal	0,73	0,56	0,08	
II. Cu sistem polienic retro				
Eschscholtxantină ester (trans)	1,78	1,46	1,00	0,20
Eschscholtxantină ester (cis)	0,44	0,42	0,34	0,06
Subtotal	2,22	1,88	1,34	0,26
Total carotenoide	8,95	8,35	6,89	1,40

principal numai în petalele portocalii și în petalele portocalii cu pete galbene.

Eschscholtxantina rămîne pigmentul caracteristic pentru toate varietățile de *Eschscholtzia californica*, prin faptul că este singura carotenoidă cu sistem polienic retro. În acest sens ea are și importanță carotenotaxonomică.

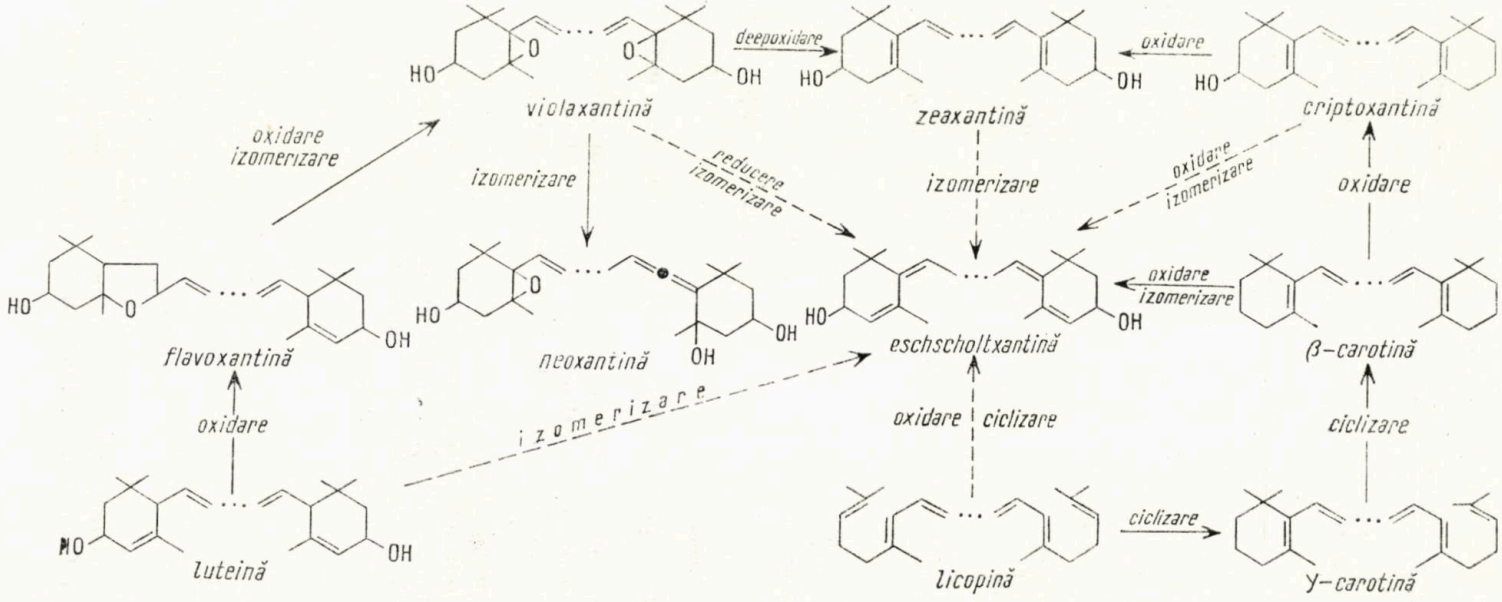
Pe baza pigmenților carotenoidici identificați în frunze, muguri florali și flori, propunem o schemă probabilă de biosinteză a carotenoidelor din florile portocalii de *Eschscholtzia californica* (schema 2), din care rezultă multiplele posibilități de formare a eschscholtxantinei, pigment caracteristic pentru această specie.

CONCLUZII

Eschscholtzia californica este o plantă cu un conținut ridicat de carotenoide la nivelul mugurilor florali și al florilor. Pigmentul caracteristic pentru această specie este eschscholtxantina, care are sistem polienic retro.

În timpul creșterii și îmbătrînirii frunzelor se produc schimbări în conținutul de carotenoide și în raporturile cantitative dintre acestea.

În mugurii florali și în flori au loc procese intense de carotenogeneză.



Schema 2. — Mecanismul ipotetic al biosintezei pigmenţilor carotenoidici din florile portocalii de *Eschscholtzia californica*.

Florile portocalii de *Eschscholtzia californica* constituie o sursă importantă pentru obținerea eschscholtxantinei.

Prezentat la redacție la 30.XI.1972

Institutul agronomic „Dr. Petru Groza"
Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. H. H. Strain, J. biol. Chem., **123**, 425 (1938).
2. T. W. Goodwin, *Stravnitelinaia biohimia karotinoidov*, Izdatelistvo Innostrannoi Literaturî, Moscova, 1954, p. 60.
3. R. Entschel, P. Karrer, Helv. chim. Acta, **40**, 1809 (1957).
4. T. W. Goodwin, *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Acad. Press, London and New York, 1965, p. 137, 489.
5. O. Isler, *Carotenoids*, Birkhäuser-Verlag, Basel und Stuttgart, 1971, p. 37, 288, 602, 788.
6. G. Neamțu, C. Bodea, St. cerc. biochim., **12**, 77 (1969).
7. G. Neamțu, C. Bodea, St. cerc. biochim., **15**, 181 (1972).
8. C. Costes, Ann. Physiol. Veg., **5**, 115 (1963).
9. C. Costes, Phytochemistry, **5**, 311 (1966).
10. H. H. Strain, M. R. Thomas, I. I. Katz, J. Org. Chem., **26**, 5061 (1961).
11. K. Lunde, L. Zechmeister, J. amer. chem. Soc., **77**, 1647 (1955).
12. C. Bodea, V. Tămaș, G. Neamțu, St. cerc. chim., **13**, 883 (1964).
13. P. Karrer, H. Leumann, Helv. chim. Acta, **34**, 445 (1951).
14. L. Jaeger, P. Karrer, Helv. chim. Acta, **46**, 687 (1963).
15. T. W. Goodwin, R.J.H. Williams, G. Button, *Pre-symposium on Carotenoids other than Vitamine A*, Trondheim, Norvegia, 1966, p. 8.
16. R.J.H. Williams, G. Britton, T. W. Goodwin, Biochim. biophys. Acta, **124**, 200 (1966).

CONTRIBUTIONS TO THE BIOSYNTHESIS OF CAROTENOIDS. VI, BIOSYNTHESIS OF CAROTENOIDS IN *ESCHSCHOLTZIA CALIFORNICA*

SUMMARY

The carotenoids from leaves of *Eschscholtzia californica*, collected at different periods, from buds in different stages of development and from flowers of different colour, have been determined.

Varieties with orange flowers are richer in carotenoids than those with yellow flowers. Eschscholtxanthin with retro polyenic system occurs in buds and flowers, but not in leaves.

A scheme is further proposed of the biosynthesis of carotenoids pigments in the orange flowers of *Eschscholtzia californica*.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 2, 181–184 (1973)

MODIFICĂRI ALE CONȚINUTULUI ÎN AMINOACIZI LIBERI LA *TETRAMORIUM CAESPITUM* L. *(FORMICIDAE-HYMENOPTERA)* COLECTAT DIN ZONE DIFERITE

DINU PARASCHIVESCU și ILEANA HURGHIȘIU

Rezumat. — S-a efectuat un studiu comparativ asupra conținutului în aminoacizi liberi la *Tetramorium caespitum* L., din următoarele localități: Gh. Gheorghiu-Dej, Bogdănești, jud. Bacău, și Bicaz, jud. Neamț, în mai și septembrie 1972. S-au găsit modificări în conținutul aminoacizilor liberi de la o zonă la alta și la perioade diferite, în aceeași zonă. Modificări semnificative s-au înregistrat la nivelul cisteină-cistină, tirozină-metionină, alanină, fenilalanină și leucină.

Aprecierea caracterelor ecologice ale insectelor, reglarea relațiilor dintre insecte și mediu, precum și stabilirea pozițiilor lor taxonomice necesită studii biochimice aprofundate.

Pînă în prezent cercetările efectuate în cadrul familiei *Formicidae* s-au rezumat numai la un singur gen, și anume *Formica* L., cercetîndu-se de către Schmidt [8], [9] modificările substanțelor de rezervă și ale celor fotoactive.

În lucrări anterioare s-au inițiat cercetări asupra aminoacizilor la insecte, de către Auclair [2], care face o comparație între aminoacizii prezenți în hemolimfa afidelor și sucul pe care îl secretă acestea. Drilhon și Busnel [5] au efectuat un studiu asupra aminoacizilor liberi la *Bombix mori*. Cercetări similare au efectuat Agrill [1], Drilhon [4], Chen și Hadorn [3], Duchateau și Florkin [6].

Zamfirescu și Hurghișiu [11] au urmărit modificarea aminoacizilor liberi la *Tenthredo arcuata* Först., în cursul perioadei de imago, constatînd diferențe între sexe în cursul acestei perioade.

Pînă în prezent nu s-a efectuat un studiu asupra modificării conținutului în aminoacizi liberi la specia *Tetramorium caespitum* L., care are o importanță ecologică deosebită, avînd un mare grad de plasticitate. Menționăm că în prezent această specie este cercetată în vederea combaterii gîndacului de Colorado.

În lucrarea de față prezentăm rezultatele cercetărilor noastre care cuprind un studiu comparativ al aminoacizilor liberi la *Tetramorium caespitum* L., colectat din diferite zone.

MATERIAL ŞI METODĂ

Colectările de material la specia *Tetramorium caespitum* L. s-au efectuat în lunile mai şi septembrie 1972, din localităţile Bogdăneşti, Gh. Gheorghiu-Dej, jud. Bacău, şi Bicaz, jud. Neamţ.

S-au colectat furnici lucrătoare direct din cuiburi construite sub piatră, la altitudini de circa 400 m (Bogdăneşti şi Gh. Gheorghiu-Dej) şi 800 m (Bicaz).

Materialul viu s-a prelucrat în vederea extracţiei aminoacizilor liberi. Extracţia s-a făcut din 1 g de insecte (aproximativ 50 de exemplare), care s-au mojarat cu apă distilată imediat după recoltare. Proteinele s-au precipitat cu acetonă clorhidrică 1%, după care au urmat îndepărtarea precipitatului format şi spălarea supernatantului apos cu eter etilic [7], [10]. Stratul apos s-a evaporat la sec, iar reziduul s-a reluat cu o soluţie de amoniac 0,5 n, care s-a aplicat sub formă de spoturi pe hîrtia cromatografică MN 263.

Ca solvent pentru migrare s-a folosit un amestec de n-butanol — acid acetic — apă (4 : 1 : 1). Migrarea s-a făcut ascendent, timp de 48 de ore. Cromatogramele s-au pulverizat cu ninhidrină 0,2% în butanol.

S-au făcut aprecieri calitative.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele sînt cuprinse în tabela 1, din care reiese că apar diferenţe în compoziţia aminoacizilor liberi în zonele Bogdăneşti, Gh. Gheor-

Tabela 1

Modificarea conţinutului în aminoacizi liberi la *Tetramorium caespitum* L. colectat la epoci şi din zone diferite

Aminoacizi	Mai 1972		Septembrie 1972		
	Bogdăneşti	Gh. Gheorghiu-Dej	Bogdăneşti	Gh. Gheorghiu-Dej	Bicaz
Cistină-cisteină	—	+	+	+	+
Lizină-histidină-arginină	+	+	+	+	+
Acid aspartic-serină-glicocol	+	+	+	+	+
Acid glutamic-treonină	+	+	+	+	+
Alanină	+	+	+	+	+
Prolină	—	—	—	—	—
Tirozină-metionină	+	+	—	+	—
Valină	+	+	—	+	—
Fenilalanină	+	+	—	+	—
Leucină	+	—	—	+	—

ghiu-Dej şi Bicaz, de la o perioadă de colectare la alta. În luna mai apar diferenţe între Bogdăneşti şi Gh. Gheorghiu-Dej la cistină-cisteină şi leucină, în sensul că, în timp ce primii aminoacizi lipsesc la Bogdăneşti, sînt prezenţi la Gh. Gheorghiu-Dej, iar ultimul este prezent la Bogdăneşti, dar lipseşte la Gh. Gheorghiu-Dej. În luna septembrie diferenţele s-au constatat la tirozină-metionină, valină, fenilalanină şi leucină, în sensul că, în timp ce la Bogdăneşti şi Bicaz aceştia lipsesc, la Gh. Gheorghiu-Dej s-au identificat. Se remarcă că în cadrul aceleiaşi localităţi (Bogdăneşti) în general numărul aminoacizilor este crescut în luna mai comparativ cu septembrie. La Gh. Gheorghiu-Dej, diferenţele sînt în general puţin semnificative între cele două luni. La Bicaz, în septembrie, numărul aminoacizilor este asemănător cu cel identificat la Bogdăneşti.

Pe baza rezultatelor prezentate mai sus şi a datelor anterioare obţinute [11], s-au constatat diferenţe din punct de vedere calitativ în compoziţia aminoacizilor liberi la *Tetramorium caespitum* L., colectat din diferite zone, precum şi diferenţe de la o perioadă de recoltare la alta.

Considerăm că modificările înregistrate în compoziţia aminoacizilor la specia *Tetramorium caespitum* L. sînt corelate cu condiţiile ecologice specifice şi, probabil, cu o oarecare influenţă a mediului poluant existent în localităţile Gh. Gheorghiu-Dej şi Bicaz.

CONCLUZII

1. Specia de formicide *Tetramorium caespitum* L. prezintă unele modificări în conţinutul aminoacizilor liberi de la o localitate la alta şi la date diferite de colectare.

2. Diferenţe semnificative apar la cistină-cisteină, tirozină-metionină, alanină, fenilalanină şi leucină.

Prezentat la redacţie la 17 ianuarie 1973

Institutul de ştiinţe biologice,
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. I. Agrill, Acta physiol. scand., **18**, 247 (1949).
2. J. L. Auclair, J. Ins. Physiol., **2**, 330 (1958).
3. P. S. Chen, E. Hadorn, Rev. suisse Zool., **61**, 437 (1954).
4. A. Drilhon, C.R. Soc. Biol., **144**, 224 (1950).
5. A. Drilhon, R. G. Busnel, Rev. Ver. Soie, **1**, 51 (1949).
6. G. Duchateau, M. Florkin, Arch. int. Physiol. Biochim., **66**, 573 (1954).
7. I. M. Haïs, K. Macek, *Cromatografia pe hîrtie*, Edit. tehnică, Bucureşti, 1960, p. 409.
8. G. H. Schmidt, Biol. Zentr., **86**, 1 (1967).
9. G. H. Schmidt, Proc. VI Congr. IUSSI, Bern (1969).
10. I. Tănase, *Tehnica cromatografică*, Edit. tehnică, Bucureşti, 1967, p. 10.
11. A. Zamfirescu, I. Hurghişiu, St. cerc. biochim., **15**, 311 (1972).

MODIFICATIONS OF THE CONTENT IN FREE AMINO-ACIDS IN *TETRAMORIUM CAESPITUM* L. (*FORMICIDAE-HYMENOPTERA*) FROM DIFFERENT REGIONS

SUMMARY

A comparative study was carried out concerning the content in free amino-acids in *Tetramorium caespitum* L. from the following localities : Gh. Gheorghiu-Dej, Bogdăneşti, Bacău district and Bicaz, Neamţ district, in May and September 1972.

Modifications have been found in free amino-acids content, from one zone to another and at different periods, in the same zone. Significant modifications were recorded at the level of cysteine-cystine, tyrosine-methionine, alanine, phenylalanine and leucine.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 2, 185–193 (1973)

FOSFATAZA ACIDĂ DIN FRUNZELE DE PORUMB. CERCETĂRI CROMATOGRAFICE

DOINA POPOV

Rezumat. — După gel-filtrarea preliminară a extractelor de frunze de porumb pe coloană de Sephadex G–25 și Sephadex G–100, fracțiunile cu activitate fosfatazică acidă s-au cromatografiat pe DEAE-celuloză în două variante experimentale : în tampon Tris-HCl 0,01 M, pH = 7,6, și în tampon acid acetic-acetat de sodiu 0,01 M, pH 5,5. Eluția fosfatazei acide s-a realizat în gradient liniar de NaCl. Separarea cromatografică în tampon Tris-HCl evidențiază două fracțiuni ale fosfatazei acide : una minoră, neadsorbită (T_1), și cealaltă majoră, adsorbită (T_2). Separarea cromatografică în tampon acid acetic-acetat de sodiu evidențiază trei fracțiuni ale fosfatazei acide : una neadsorbită (A_1) și două adsorbite (A_2 și A_3). Individualitatea fiecărei fracțiuni cromatografice s-a testat electroforetic în gel de poliacrilamidă. Notăm că ionii tamponului acid acetic-acetat de sodiu determină o eterogenitate a fracțiunilor fosfatazice evidențiate cromatografic și electroforetic. Fosfataza acidă din maximele T_2 și A_3 — obținută în sisteme tampon diferite — se comportă similar la influența temperaturii, a efectorilor adăugați mediului de reacție și față de diferiți compuși fosforilați utilizați ca substrate. Fosfataza acidă din maximul neadsorbit în tampon acetat (A_1) este diferită de enzima adsorbită (T_2 și A_3), fapt demonstrat de comportarea la influența efectorilor și de datele asupra specificității de substrat. În frunzele de porumb există deci două fosfataze acide.

Fosfataza acidă (ortofosforic monoester fosfohidrolaza E.C. 3.1.3.2) a fost izolată în diferite grade de puritate din germeni de grîu [1], [2], din plantule de fasole [3], din rădăcini de cartofi dulci [4] și din frunze de tutun [5]. Enzimele izolate au fost apoi caracterizate în ceea ce privește comportarea electroforetică, cromatografică, specificitatea de substrat, unele constante cinetice etc.

Fosfataza acidă din frunzele de porumb a fost caracterizată sub aspect electroforetic și imunochimic în cercetările noastre anterioare [6]–[8]. S-au evidențiat patru fracțiuni fosfatazice la electroforeza preparatelor proteice brute din frunzele de porumb în gel de poliacrilamidă și două fracțiuni la electroforeza în gel de agaroză. Studiul imunochimic a relevat existența în frunzele de porumb a două fosfataze acide, diferite din punct de vedere antigenic.

În continuarea cercetărilor asupra fosfatazei acide din frunzele de porumb, ne-am propus în lucrarea de față să urmărim comportarea cromatografică a acestei enzime pe schimbătorul de ioni DEAE-celuloză. În scopul cunoașterii proprietăților diferitelor fracțiuni ale fosfatazei acide evidențiate pe această cale, unele din maximele obținute au fost

caracterizate sub aspect electroforetic, al stabilității termice, al influenței efectorilor și al activității asupra diferiților compuși fosforilați utilizați ca substrate.

MATERIAL ȘI METODĂ

Cercetările s-au efectuat pe frunze de porumb (HD-310) recoltate la 10 zile de la semănare (7 zile de la răsărire). Conținutul în apă al frunzelor a fost de 92 %.

Obținerea preparatelor de fosfatază acidă. Frunzele de porumb s-au trecut printr-o moară de laborator și s-au extras în soluție de NaCl 9‰ (1 g material vegetal umed/0,4 ml extractant) timp de 1 oră, la temperatura camerei. Componenții celulari sedimentabili la 4 500 g, timp de 15 min, s-au îndepărtat prin centrifugare. (Aceștia conțineau 4 % din activitatea fosfatazică a extractelor, față de p-nitrofenilfosfat (p-NPP) ca substrat.) Nu s-a observat nici o activitate a componenților celulari sedimentați față de β-glicerofosfat de sodiu ca substrat.

Supernatantul de la 4 500 g (extract brut) s-a concentrat prin perevaporare în curent de aer și apoi s-a trecut pe o coloană (4 × 20 cm) de Sephadex G-25 medium, echilibrată în tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 8 [4]. Filtratul cu activitate fosfatazică obținut s-a concentrat prin perevaporare și s-a trecut pe o coloană (2,5 × 45 cm) de Sephadex G-100, echilibrată în tampon acetat 0,1 M, pH 5,5, conținînd NaCl 0,1 M [3]. Fracțiunea enzimatic activă filtrată a prezentat 90 % din activitatea fosfatazică aplicată pe coloană. După concentrare prin perevaporare, acest preparat s-a supus cromatografierii pe DEAE-celuloză.

Extractul enzimatic (10 ml, conținut de proteină de 3 mg/ml) s-a cromatografiat pe o coloană (2 × 20 cm) de DEAE-celuloză, în două variante experimentale : (a) în tampon Tris-HCl 0,01 M, pH 7,6, și (b) în tampon acid acetic-acetat de sodiu 0,01 M, pH 5,5. Prin coloană s-a trecut tamponul de echilibrare, pînă cînd nu s-a mai eluat nici o substanță care absoarbe la 280 mμ. Eluția enzimei s-a realizat în gradient liniar de NaCl de la zero la 1 M în cazul cromatografiei în tampon Tris-HCl și de la zero la 1,2 M în cazul cromatografiei în tampon acid acetic-acetat de sodiu.

Diferitele fracțiuni cu activitate fosfatazică s-au păstrat în stare înghețată la —10°C, pînă la utilizare.

Determinarea activității fosfatazei acide. Activitatea fosfatazei acide s-a estimat față de două substrate : p-nitrofenilfosfat (sare disodică) și β-glicerofosfat de sodiu. Cu p-NPP ca substrat s-a lucrat după principiul metodelor utilizate de Verjee [2] și Ikawa și colab. [9], adaptate la condițiile noastre. Amestecul de reacție a conținut : 100 μ moli de tampon acid acetic-acetat de sodiu, pH 5,5, 7 μ moli p-NPP și enzimă, într-un volum final de 2 ml. După incubare de 30 min la 30°C, reacția s-a oprit prin adaos de 2 ml NaOH 0,1 M și absorbanța soluției s-a măsurat la 400 mμ față de un martor lipsit de enzimă. Valorile găsite s-au citit pe o curbă etalon construită cu p-nitrofenol.

Cu β-glicerofosfat de sodiu ca substrat, amestecul de reacție a conținut : 200 μ moli tampon acid acetic-acetat de sodiu, pH 5,5, 50 μ

moli β-glicerofosfat de sodiu şi enzimă într-un volum final de 3 ml. După incubare de 30 min la 30°C, reacţia s-a oprit prin adaos de 3 ml acid tricloracetic 10 %, fiind urmată de determinarea fosforului anorganic prin metoda Fiske-SubbaRow. Martorul fiecărei probe s-a făcut fără enzimă.

În unele experienţe s-a determinat activitatea fosfatazei acide faţă de pirofosfatul de sodiu (PP) ca substrat. Condiţiile de reacţie erau aceleaşi cu cele utilizate în cazul β-glicerofosfatului, cu excepţia folosirii unei concentraţii de pirofosfat de sodiu de 10 μ moli.

În studiul stabilităţii termice, fracţiunile cu activitate fosfatazică s-au incubat — fără substrat — la temperaturi cuprinse între 30 şi 80°C, timp de 10 min [5]. După răcire la temperatura camerei, reacţia s-a desfăşurat cu p-NPP ca substrat.

Urmărirea influenţei efectorilor : molibdat de amoniu (1×10^{-3} M), fosfat monopotasic, fluorură de sodiu şi citrat de sodiu (2×10^{-3} M) asupra activităţii fosfatazice a unor fracţiuni cromatografice s-a făcut, faţă de p-NPP ca substrat, prin ţinerea prealabilă a enzimei în prezenţa efectorilor timp de 15 min la 30°C.

Activitatea fosfatazică a unor fracţiuni cromatografice faţă de : PP, p-NPP, β-glicerofosfat, adenozină 3′-fosfat, adenozină 5′-fosfat, adenozină 3′(2′)-fosfat, guanozină 3′(2′)-fosfat, şi uridină 3′(2′)-fosfat — în concentraţii de 10 μ moli — s-a estimat prin cantitatea de fosfat anorganic eliberat, în condiţiile de reacţie de la β-glicerofosfat ca substrat.

Determinarea proteinelor. Conţinutul în proteină s-a determinat spectrofotometric la 280 mμ, utilizînd spectrofotometrul VSU-2, sau colorimetric, prin metoda Lowry modificată de Miller [10], cu albumină serică de bovină ca standard.

Electroforeza fosfatazei acide din extractele brute şi din diferitele fracţiuni cromatografice s-a efectuat după metoda [11] — în gel vertical de poliacrilamidă 5 %, tampon TRIS-EDTA-H_3BO_3, pH 8,2 —, utilizată în cercetările noastre anterioare [6], [7]. Fosfataza acidă s-a evidenţiat prin azo-cuplare cu α-naftilfosfat de sodiu, ca substrat, şi cu sarea de diazoniu fast Garnet GBC, ca agent de cuplare [12]. Revelarea benzilor enzimei s-a făcut prin incubarea gelurilor în amestecul de mai sus, timp de 3 ore la 37°C.

Trasarea gradientului ionului de Cl^- s-a făcut prin titrare cu o soluţie de $AgNO_3$ 0,02 N, în prezenţă de cromat de potasiu.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Separarea cromatografică a fosfatazei acide din frunzele de porumb. Extractele din frunze de porumb s-au prelucrat prin metode blînde — gel-filtrare pe Sephadex G-25 şi Sephadex G-100 —, în scopul de a menţine structura enzimei cît mai apropiată de cea nativă. S-a constatat că fracţiunile electroforetic distincte ale fosfatazei acide din extractele brute s-au regăsit după aceste prelucrări (fig. 1).

Separarea cromatografică a fosfatazei acide din frunzele de porumb pe DEAE-celuloză în tampon Tris-HCl 0,01 M pH = 7,6 (fig. 2) eviden-

ţiază două maxime ale enzimei: unul — minor — ce trece neadsorbit (T_1) şi al doilea — major — eluat la concentraţii ale gradientului de NaCl cuprinse între 0,15 şi 0,8 M (T_2).

Maximul T_1 — neadsorbit — prezintă o activitate fosfatazică scăzută; curba lui de eluţie s-a putut trasa numai faţă de p-NPP ca substrat. Maximul T_2 prezintă o activitate fosfatazică foarte mare (98—99% din activitatea — faţă de p-NPP — aplicată pe coloană), evidenţiind curbe de activitate bine conturate atît faţă de p-NPP, cît şi faţă de β-glicerofosfat. Se observă că curba de activitate faţă de p-NPP ca substrat este situată pe cromatogramă mult deasupra celei trasate cu β-glicerofosfat ca substrat. La această concluzie s-a ajuns atît prin dozarea p-nitrofenolului, cît şi a fosfatului anorganic eliberat de enzimă din p-NPP. O activitate fosfatazică mare faţă de p-NPP, comparativ cu alte substrate, a fost observată şi de Ikawa şi colab. [9] în cercetarea diferitelor fracţiuni cromatografice ale enzimei din spicele de orez.

O caracteristică a fosfatazei acide din maximul T_2 o constituie eluţia acesteia de pe schimbător într-un interval larg de concentraţii ale gradientului, superior celui stabilit în cazul enzimei din germenii de grîu [2], din rădăcinile de cartofi dulci [4], din frunzele de tutun [5] şi din spicele de orez [9].

Recromatografierea maximului T_2 a evidenţiat tot un maxim cu activitate fosfatazică, în aceeaşi poziţie pe cromatogramă.

S-a analizat separarea electroforetică a fosfatazei acide din maximele T_1 şi T_2, comparativ cu enzima dintr-un preparat brut de frunze de porumb (fig. 3). În primul rînd sînt necesare unele precizări cu privire la enzimograma preparatelor brute. Metoda de azo-cuplare utilizată în lucrarea de faţă a evidenţiat aceleaşi fracţiuni ale enzimei ca şi metoda de revelare bazată pe formarea albastrului de molibden, utilizată în cercetările noastre anterioare [6], [7]. Sensibilitatea mare a metodei azocuplării în evidenţierea unor activităţi fosfatazice scăzute ne-a determinat să preferăm această metodă pentru vizualizarea pe enzimograme a activităţii fracţiunilor cromatografice. Separarea electroforetică a fosfatazei acide din maximul T_1 a evidenţiat două fracţiuni, cu activitate scăzută, corespunzătoare ca migrare fracţiunilor mai slab electronegative din preparatele brute (fig. 3). Maximul T_2 s-a separat la electroforeză ca o singură zonă lată, corespunzătoare din punct de vedere al sarcinii electrice globale fracţiunii puternic electronegative din preparatele brute de frunze. În cercetările anterioare [6], [7] am considerat această fracţiune — pe baza arcuirii marginilor laterale — ca fiind alcătuită din două benzi electroforetice care se întrepătrund. Separarea electroforetică a fosfatazei acide din maximul T_2 într-o singură fracţiune, ca şi evidenţierea unui singur maxim la recromatografierea acestuia, indică prezenţa în frunzele de porumb a unei singure fracţiuni fosfatazice puternic electronegativă.

Separarea cromatografică a fosfatazei acide din frunzele de porumb în tampon acid acetic-acetat de sodiu 0,01 M, pH 5,5 (fig. 4), evidenţiază 3 maxime ale enzimei: primul, ce trece neadsorbit (A_1, 9% din activitatea enzimei aplicate), al doilea, eluat la concentraţii scăzute ale gradientului (0—0,12 M, A_2,1% din activitatea aplicată), şi al treilea maxim,

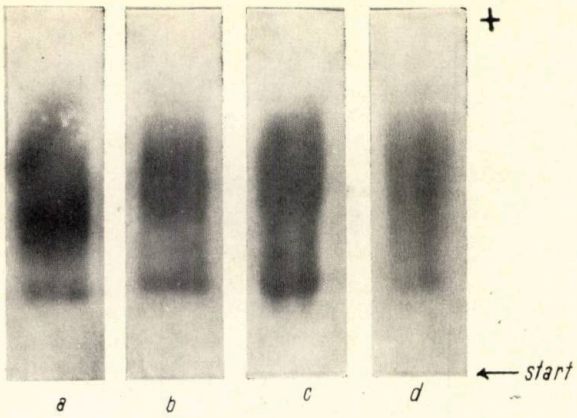


Fig. 1. — Enzimograma — în gel de poliacrilamidă — a fosfatazei acide din extracte brute de frunze de porumb (*a*), din extracte brute concentrate supuse gel-filtrării de Sephadex G-25 (*b*), din filtratele de pe Sephadex G-25 concentrate și aplicate pe coloana de Sephadex G-100 (*c*) și din eluatul concentrat de pe Sephadex G-100 supus cromatografiei pe DEAE-celuloză (*d*). Activitatea fosfatazică aplicată 5 μ M p-nitrofenol eliberat/0,1 ml.

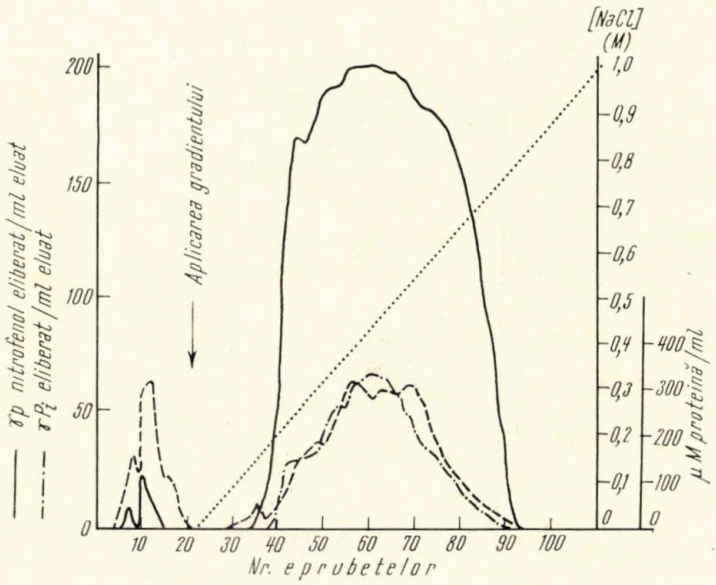


Fig. 2. — Cromatografia fosfatazei acide din frunzele de porumb pe DEAE-celuloză în tampon Tris-HCl 0,01 M, pH 7, 6. Viteza de curgere a fost de 0,66 ml/min. S-au colectat 80—100 fracțiuni, în volume de cîte 5 ml. Separarea cromatografică s-a realizat la temperatura camerei, cu un colector de fracțiuni ULTRORAC LKB-7 000.

——————substrat p-nitrofenilfosfat
— . — . — substrat β-glicerofosfat
——·——·—— proteine
. . . . . gradientul de clorură.

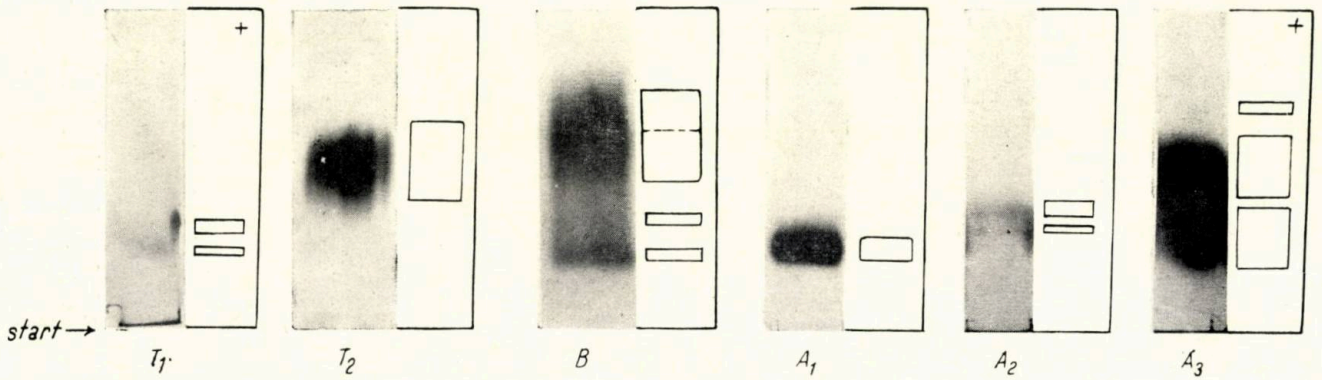


Fig. 3. — Enzimograma — în gel de poliacrilamidă — a fosfatazei acide din maximele separate în tampon Tris-HCl (T_1 și T_2) și în tampon acid acetic-acetat de sodiu (A_1, A_2, A_3) comparativ cu un preparat brut din frunzele de porumb (B).

principal, eluat la concentrații ale gradientului cuprinse între 0,15 și 1,00 M (A_3, 90% din activitatea enzimei aplicate pe coloană).

Maximele A_1 și A_3 conțin fosfataze acide ce pot fi evidențiate atît cu p-NPP, cît și cu β-glicerofosfat ca substrate. Remarcăm și în acest caz activitatea fosfatazică mare față de p-NPP, comparativ cu β-glicero-

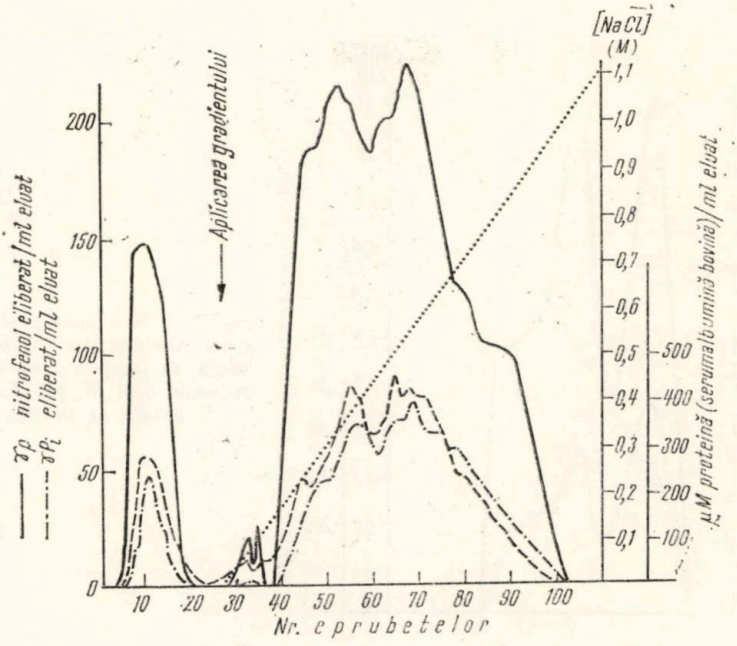


Fig. 4. — Cromatografia fosfatazei acide din frunzele de porumb pe DEAE-celuloză în tampon acid acetic-acetat de sodiu 0,01 M, pH 5,5. (Aceleași explicații ca la figura 2.)

fosfat. Maximul A_2 prezintă o activitate fosfatazică scăzută, și de aceea nu a putut fi evidențiat decît cu p-NPP ca substrat.

Fosfataza acidă din maximul A_3 se eluează de pe schimbător într-un interval larg de concentrații ale gradientului, la valori apropiate eluției enzimei din maximul T_2, obținut în soluții tampon Tris-HCl.

Aspectul curbei cromatografice a maximului A_3 ne-a determinat să urmărim comportarea acestuia la recromatografiere (fig. 5). Se observă separarea netă a fosfatazei din maximul A_3 în două maxime și un platou.

Separarea electroforetică a fosfatazei acide din maximul A_1 evidențiază o singură fracțiune a enzimei, corespunzătoare ca migrare fracțiunilor mai slab electronegative din preparatele brute; maximul A_2 se separă în două fracțiuni cu activitate enzimatică scăzută, iar maximul A_3 în trei fracțiuni, dintre care două cu activitate fosfatazică puternică (fig. 3).

Eterogenitatea electroforetică și cromatografică a fosfatazei acide din maximul A_3 — obținut în tampon acid acetic-acetat de sodiu —, spre deosebire de fosfataza din maximul T_2—obținut în tampon Tris-

HCl —, este datorată, desigur, unor modificări ale stării de ionizare a moleculei enzimei, cauzate de ionii de acetat. Un efect similar a fost observat de Staples şi McCarthy [13] la cercetarea electroforetică a fosfatazei acide din frunzele de fasole.

Proprietăţile electroforetice ale fracţiunilor cromatografice ale fosfatazei acide din frunzele de porumb au fost completate de analiza

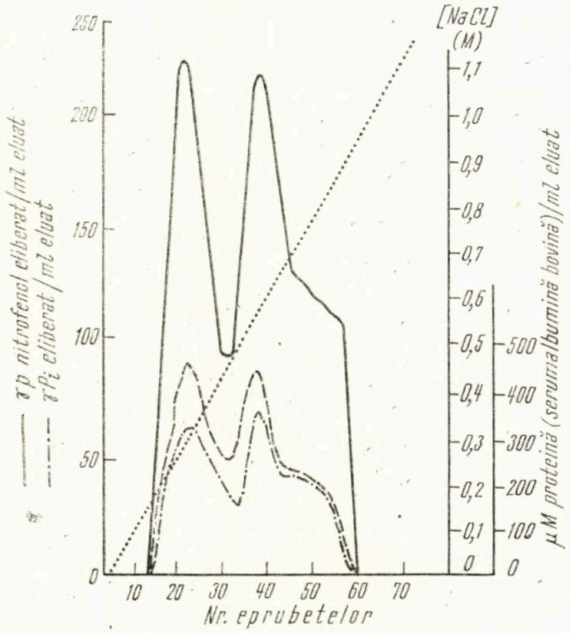


Fig. 5. — Recromatografia fosfatazei acide din maximul A_3 pe DEAE-celuloză în tampon acid acetic-acetat de sodiu 0,01 M, pH 5,5. (Aceleaşi notaţii ca la figura 2.)

comportării enzimei la influenţa temperaturii, a efectorilor adăugaţi mediului de reacţie şi a activităţii faţă de diferiţi compuşi fosforilaţi, utilizaţi ca substrate. Aceste proprietăţi au fost analizate pentru maximele cu activitate fosfatazică mare: A_1 (neadsorbit în tampon acid acetic-acetat) şi T_2 şi A_3 (adsorbite în tampon Tris şi, respectiv, în tampon acid acetic-acetat). Activităţile fosfatazice foarte scăzute ale maximelor T_1 şi A_2 nu au făcut posibilă caracterizarea acestora.

Influenţa temperaturii. Fosfataza acidă din maximele T_2 şi A_3, obţinute la cromatografia în tampoane şi pH-uri diferite, se comportă similar la temperaturile de 40 şi 50°C (tabela 1). Comportamentul întrucîtva diferit al fosfatazei celor două maxime la temperaturile de 60 şi 70°C este cauzat probabil de influenţa ionilor tampoanelor de cromatografiere asupra moleculei enzimei.

Remarcăm stabilitatea termică deosebit de mare a activităţii fosfatazice faţă de p-NPP ca substrat, fapt constatat şi de Shaw [5] în cazul enzimei din frunzele de tutun şi de Verjee [2] pentru fosfataza din germenii de grîu.

Influenţa efectorilor. Fosfataza acidă din maximul T_2, obţinut în tampon Tris-HCl, şi din maximele A_1 şi A_3, obţinute în tampon acid acetic-

acetat de sodiu (tabela 2), se comportă față de efectori asemănător cu enzima din alte surse vegetale, fiind inhibată de ionii de molibdat și fluorură [2], [5]. Ionii de fosfat și citrat au o influență mai diferențiată în funcție de maximul cromatografic analizat. Ionii de citrat erau inhibitori ai fosfatazelor acide din preparate brute de frunze de porumb, față de β-glicerofosfat ca substrat [14].

Tabela 1

Influența temperaturii asupra fosfatazei acide din maximele cromatografice T_2 și A_3

(Activitatea fosfatazică s-a exprimat în procente față de activitatea de la 30° C. Substrat: p-NPP)

t° (°C)	Maximul analizat	
	T_2 (%)	A_3 (%)
30	100	100
40	98	98
50	93	91
60	80	70
70	28	18
80	0	0

Tabela 2

Influența efectorilor adăugați mediului de reacție asupra activității fosfatazei acide din maximele cromatografice T_2, A_1 și A_3

(Activitatea fosfatazică s-a exprimat în procente față de activitatea probelor lipsite de efector, Substrat: p-NPP)

Efector	Maximul analizat		
	T_2	A_1	A_3
fără	100 %	100 %	100 %
molibdat	44	11	35
fosfat	98	40	90
fluorură	68	20	59
citrat	100	80	101

Remarcăm comportarea similară la influența efectorilor a fosfatazei acide din maximele T_2 și A_3, obținute la cromatografia în tampoane și la pH-uri diferite, fapt ce ar sugera existența aceleiași enzime în maximele cromatografice respective. Fosfataza acidă din maximul A_1 — ce trece neadsorbit în tampon acetat — are însă o comportare diferită la acțiunea efectorilor adăugați mediului de reacție. Ea este mult mai susceptibilă la acțiunea inhibitorie a ionilor adăugați, comparativ cu fosfataza maximelor T_2 și A_3. Rezultatele de mai sus atestă existența în frunzele de porumb a 2 fosfataze acide cu comportări diferite la influența efectorilor adăugați mediului de reacție. Dealtfel, pe cale imunochimică, noi am dovedit prezența în frunzele de porumb a două fosfataze acide, diferite din punct de vedere antigenic [8].

Acțiunea asupra unor compuși fosforilați utilizați ca substrate. Fosfataza acidă din maximul T_2, separat în tampon Tris-HCl, și din maximele A_1 și A_3, obținute în tampon acid acetic-acetat de sodiu, prezintă în special activitate pirofosfatazică (tabela 3). Prezența unei activități pirofosfatazice puternice în unele fracțiuni cromatografice ale fosfatazei acide a fost semnalată în literatură [4], [9] , [15], [16]. Activitatea pirofosfatazică marcată a preparatelor noastre ne-a făcut să exprimăm activitatea față de ceilalți compuși fosforilați utilizați ca substrate în procente din activitatea față de pirofosfat (tabela 3).

Fosfataza acidă din maximele T_2 și A_3, obținute în tampoane diferite, scindează — în ordinea scăderii activității — p-NPP, nucleozidfosfații și β-glicerofosfatul. Fosfataza acidă din maximul A_1 — ce trece neadsorbit în tampon acetat — are o comportare diferită. Ea scindează — în ordinea scăderii activității — p-NPP, β-glicerofosfatul și nucleozidfosfații. Comportarea diferită a fosfatazei maximului A_1 o distinge de

fosfataza maximelor T_2 și, respectiv, A_3, constituind un argument pentru existența în frunzele de porumb a două fosfataze acide. Criteriile folosite de noi în această lucrare nu sînt însă suficiente pentru a aprecia dacă aceste două fosfataze acide sînt enzime diferite sau izoenzime ale aceleiași enzime.

Tabela 3

Activitatea fosfatazică a maximelor cromatografice T_2, A_1 și A_3 asupra unor compuși fosforilați utilizați ca substrate

(Activitatea fosfatazică s-a exprimat în procente din activitatea cu PP ca substrat)

Substrat	Maximul analizat		
	T_2	A_1	A_3
PP	100	100	100
p-NPP	83	52	74
β-glicerofosfat	27	20	24
adenozină 3′-fosfat	50	10	50
adenozină 5′-fosfat	49	11	45
adenozină 3′(2′)-fosfat	42	12	40
guanozină 3′(2′)-fosfat	46	10	44
uridină 3′(2′)-fosfat	49	10	38

CONCLUZII

1. Cromatografia pe DEAE-celuloză în tampon Tris-HCl 0,01 M, pH 7,6, separă fosfataza acidă din frunzele de porumb în două fracțiuni: una minoră, neadsorbită (T_1), și cealaltă, majoră, adsorbită (T_2). În tampon acid acetic-acetat de sodiu 0,01 M, pH 5,5, se separă trei fracțiuni ale enzimei: una neadsorbită (A_1) și două adsorbite (A_2 și A_3).

2. Fracțiunile cromatografice puternic adsorbite, T_2 și, respectiv, A_3, se eluează de pe DEAE-celuloză la valori ridicate ale gradientului de NaCl comparativ cu alte fosfataze acide vegetale.

3. Ionii tamponului acid acetic-acetat de sodiu determină o eterogenitate a fracțiunilor fosfatazice evidențiate atît cromatografic, cît și electroforetic.

4. Fosfataza acidă din maximele cromatografice prezintă o activitate pirofosfatazică foarte puternică.

5. Fosfataza acidă din maximele T_2 și A_3 — obținute în tampoane diferite — se comportă similar la influența temperaturii, a efectorilor adăugați mediului de reacție și față de diferiți compuși fosforilați utilizați ca substrate.

6. Fosfataza acidă din maximul neadsorbit în tampon acetat (A_1) este diferită de enzima adsorbită (T_2 și A_3), fapt demonstrat de comportarea la influența efectorilor și de datele asupra specificității de substrat. În frunzele de porumb există deci două fosfataze acide.

Prezentat la redacție la 20 ianuarie 1973

Institutul de biochimie,
București

BIBLIOGRAFIE

1. B. K. Joyce, S. Grisolia, J. biol. Chem., **235**, 2278 (1960).
2. Z. H. M. Verjee, Eur. J. Biochem., **9**, 439 (1968).
3. B. Felenbok, Eur. J. Biochem., **17**, 165 (1970).
4. T. Asahi, K. Sakano, T. Nomura, H. Ogawa, I. Uritani, Agr. Biol. Chem., **31**, 1394 (1967).
5. J. G. Shaw, Arch. Biochem. Biophys., **117**, 1 (1966).
6. D. Popov, St. cerc. biochim., **12**, 377 (1969).
7. V. Alexandrescu, D. Popov, Rev. roum. Biochim., **6**, 105 (1969).
8. V. Alexandrescu, D. Popov, Rev. roum. Biochim., **10**, 7 (1973).
9. T. Ikawa, K. Nisizawa, T. Miwa, Nature, **203**, 939 (1964).
10. G. L. Miller, Ann. Chem., **31**, 964 (1959).
11. D. Tănăsescu, N. Moldoveanu, St. cerc. biochim., **11**, 315 (1968).
12. J. Sahulka, Biol. Plantarum, **11**, 442 (1969).
13. R. C. Staples, W. J. McCarthy, Science, **149**, 1248 (1965).
14. V. Alexandrescu, D. Popov, St. cerc. biochim., **12**, 121 (1969).
15. D. W. A. Roberts, Canad. J. Biochem., **45**, 401 (1967).
16. D. W. A. Roberts, Enzymologia, **39**, 151 (1970).

THE ACID PHOSPHATASE OF MAIZE LEAVES. CHROMATOGRAPHIC INVESTIGATIONS

SUMMARY

After preliminary gel filtration on Sephadex G-25 and Sephadex G-100 columns of maize leaves extracts, the obtained acid phosphatase fractions were chromatographied on DEAE-cellulose in two experimental systems : i.e. in 0.01 M Tris-HCl buffer, pH 7.6 and in 0.01 M acetic acid-sodium acetate buffer, pH 5.5. The elution of acid phosphatase was performed in linear gradient of NaCl. The chromatographic separation in Tris-HCl buffer evinces two acid phosphatase fractions : an unadsorbed minor one (T_1) and an adsorbed major one (T_2). The chromatographic separation in acetic acid-sodium acetate buffer evinces three acid phosphatase fractions : one unadsorbed (A_1) and two adsorbed (A_2 and A_3). The individuality of each chromatographic fraction was electrophoretically tested in polyacrylamide gel. It is noticeable that the ions of the acetic acid-sodium acetate buffer induce a heterogeneity of phosphatase fractions chromatographically and electrophoretically evinced.

The T_2 and A_3 acid phosphatase — obtained in different buffer systems — behaves similarly to the temperature influences, to the effectors added to the reaction mixture and against different phosphorylated compounds used as substrates.

The unadsorbed acid phosphatase obtained in acetate buffer chromatography (A_1) differs from both adsorbed enzymes (T_2 and A_3), as revealed by the effectors influence and by the results of the substrate specificity. Hence maize leaves contain two acid phosphatases.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 2, 195–201 (1973)

STUDII PENTRU OXIDAREA BIOLOGICĂ A UNOR IMPURIFICATORI DIN APELE REZIDUALE DE LA SINTEZA ACRILONITRILULUI *

T. SLAVE, ALEXANDRA MIHAIL, NICULINA BURMAZ, I. NIȚELEA, E. MARICA

Rezumat. — Apa reziduală provenind de la sinteza acrilonitrilului (secția Acrilonitril a Combinatului petrochimic Pitești), care conține acid cianhidric, cianură de sodiu, acetonitril, propionitril, acrilonitril, sulfat de amoniu, acetonă, acetaldehidă și polimeri de acrilo- și propionitril, a fost tratată într-o instalație de laborator cu alimentare discontinuă cu nămol activ, adaptat în prealabil la cianură de potasiu și la acrilonitril.

Acest nămol activ adaptat la o concentrație de 32 mg/CN^-/l și care oxida cianura pînă la concentrația de 1,04 mg CN^-/l a fost puternic inhibat de apa reziduală industrială, capacitatea sa de oxidare a substanțelor organice a scăzut puternic și capacitatea de oxidare a cianurii a dispărut.

Cauza efectului toxic exercitat de apa reziduală constă nu numai în concentrația ridicată de cianură organică (100–400 mg CN^-/l), dar de asemenea în prezența în apă a unei cantități mari de polimeri de acrilo- și propionitril.

Apele reziduale de la sinteza acrilonitrilului sînt impurificate cu cianuri, acrilonitrili, acetonitrili etc. în cantități variabile.

Ionul cian exercită o acțiune toxică puternică asupra microorganismelor, datorită blocării enzimelor respiratorii. Există însă specii de bacterii, drojdii sau fungi rezistente în anumite limite la această acțiune.

Cercetînd enzimele respiratorii ale acestora, s-a constatat prezența unor enzime flavoproteice, rezistente la ionii CN^- [1].

Din levura *Pediococcus cerevisiae* s-a izolat o catalază rezistentă la azidă și cianură, iar la unele bacterii din specia *Achromobacter* s-a descris o proporționalitate directă între rezistența la cianură și cantitatea de citocrom a_2 [2].

Studiile asupra metabolizării ionului cian de către microorganisme, efectuate cu izotopi radioactivi, au arătat că 2/3 din carbonul ionului cian este utilizat în sinteză și 1/3 ca sursă de energie. Azotul din ionul cian este oxidat pînă la NO_3^-.

Pe baza acestor date experimentale s-au făcut numeroase încercări de epurare, prin metode biologice, a apelor reziduale industriale ce conțin cianuri și nitrili organici.

---

* Lucrarea a fost comunicată la Simpozionul de biocataliză, București, 9–10 iunie 1972.

Datele diferiţilor autori privind concentraţia maximă de ioni cian şi nitrili organici admisă în staţiile de epurare biologică variază în limite destul de largi. Astfel, în timp ce Lackett şi Griffits susţin că epurarea biologică, adică metabolizarea impurificatorilor organici din apă de către microflora nămolului activ, este simţitor inhibată la concentraţia de 11—22 mg HCN/l, unii autori germani arată că descompunerea substanţelor organice de către nămolul activ poate avea loc şi în prezenţa a 140 mg CN^-/l [3].

Murphy şi Nesbitt, în experienţe de laborator, au obţinut un nămol activ adaptat la ioni cian, care a oxidat o cantitate maximă de 99 mg CN^-/l.

Microorganismele din apele de suprafaţă se adaptează uşor la concentraţii de 25—50 mg acrilonitril/l. În majoritatea lucrărilor care se referă la aspectele practice ale epurării biologice a apelor reziduale ce conţin cianuri şi nitrili organici, concentraţiile maxime admise ca netoxice pentru microflora nămolului activ se situează în jurul a 10 mg CN^-/l [4].

Pe baza acestor date ne-am propus să încercăm purificarea prealabilă prin metoda biologică, cu nămol activ, a apelor reziduale bogate în cianuri, nitrili etc. aşa încît acestea să nu mai prezinte nocivitate faţă de microflora staţiilor generale de epurare biologică.

MATERIAL ŞI METODE

a. — Apa reziduală rezultată de la instalaţia pentru sinteza acrilonitrilului la Combinatul chimic Piteşti conţine următoarele substanţe provenind din procesul de producţie: acid cianhidric şi cianură de sodiu, acetonitril, propionitril, acrilonitril, sulfat de amoniu, acetonă, acetaldehidă, polimeri grei, formaţi din acrilo- şi propionitril.

Concentraţia acestor impurificatori în apă nu este constantă, ci diferă de la o şarjă la alta, predominînd însă polimerii grei (cu diferite grade de polimerizare).

Lucrările noastre au fost făcute cu mai multe loturi de apă reziduală, recoltate la diverse date calendaristice, în general din acelaşi loc.

b. — În experienţele efectuate s-a utilizat o instalaţie de laborator pentru cultivarea nămolului activ, folosind alimentarea discontinuă. Vasul de cultivare a avut o capacitate utilă de 3 l. Dispozitivul de aerare s-a introdus pînă la partea inferioară, astfel încît aerul să provoace şi o agitare mecanică a suspensiei de nămol activ.

Intensitatea aerării a fost astfel reglată încît să se menţină în apa de epurat o concentraţie de 4—5 mg oxigen dizolvat/l apă. Amestecul apă de epurat (influentul) — nămol activ se aerează 23 de ore, după care se întrerupe aerarea, se lasă să se sedimenteze timp de o oră flocoanele de nămol activ, apoi se înlătură supernatantul (efluentul) şi se adaugă apă de alimentare proaspătă în volum de 3 l. Valoarea pH-ului apei din vasul de aerare s-a menţinut în limitele 7,5 — 8, iar concentraţia nămolului activ din apa de epurat a variat între 1,5 şi 2 g/l (substanţă uscată).

c. — Adaptarea culturii de nămol activ la KCN şi acrilonitril — ACN. Iniţial s-a folosit o apă reziduală artificială, cu următoarea compoziţie:

—acetat de sodiu în concentrație echivalentă unui CCO (consum chimic de oxigen) de 1000 mg O_2/l;

— sulfat de amoniu și extract de superfosfat adăugate în raportul 100 CCO :5 N : 1 P, adică pentru 100 părți în greutate oxigen consumat, 5 părți azot din sulfat de amoniu și o parte fosfor din extract apos de superfosfat.

Într-un interval de 30 de zile s-au adăugat treptat cantități crescînde de cianură de potasiu și acrilonitril pur, pînă la concentrațiile de 32 mg CN^-/l și 100 mg ACN/l (vezi tabela 2).

Nămolul adaptat la această apă artificială s-a format dintr-un extract apos de sol din curtea institutului, la care s-a adăugat o cultură în bulion simplu a microorganismului *Pseudomonas convexa* NCIB 8176, din colecția I.C.C.F., bacterie care se dezvoltă în prezența a 500 mg ACN/l, descompunîndu-l în proporție de 35%. Microflora acestui nămol adaptat la 32 mg CN^-/l și 100 mg ACN/l a prezentat următorul aspect microscopic:

— numeroase îngrămădiri bacteriene formate în special din bacterii aparținînd genului *Pseudomonas*;

— rare bacterii libere (bacili mobili sau coci);

— protozoare: amoebe *(Amoeba proteus)* și ciliate libere (*Tetrahymena piriformis)*.

Gradul de adaptare al microflorei nămolului activ la cianură și ACN s-a determinat prin măsurarea capacității de scădere a oxidabilității apei reziduale (scăderea consumului chimic de oxigen — CCO) și a scăderii concentrației de ioni CN^- și acrilonitril — ACN.

Determinarea ionilor cian s-a făcut prin metoda iodometrică [5]; determinarea acrilonitrilului prin metoda cu sulfit de sodiu practicată și la Centrala industrială de fibre chimice Săvinești — Piatra Neamț [6]; CCO s-a determinat prin metoda oxidării cu bicromat [7].

d. — Oxidarea impurificatorilor organici din apa reziduală Pitești de către nămolul activ adaptat la cianură și acrilonitrili.

La instalația de cultivare a nămolului activ adaptat în prealabil la KCN și ACN (descrisă mai sus) s-a introdus apă reziduală Pitești (lot nr. 1), diluată pînă la o concentrație în ioni CN^- de 10 mg/l, iar CCO rezultat a fost la aproximativ 1000 mg/l.

S-a adăugat extract de superfosfat și sulfat de amoniu în proporțiile necesare, arătate mai sus. Amestecul s-a aerat 23 de ore, apoi s-a supus analizelor.

Testarea acțiunii diferitelor loturi de apă reziduală Pitești asupra metabolismului microflorei nămolului activ adaptat în prealabil la KCN și ACN s-a făcut de asemenea în instalația descrisă, folosind din fiecare lot de apă 2 sau 3 variante de diluție, adică diferite concentrații în CN^- inițial, și urmărind apoi evoluția componenților și a microflorei.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Concentrația impurificatorilor în diversele loturi de apă este foarte variabilă, așa cum se vede în tabela 1.

Tabela 1

Caracteristici fizico-chimice ale loturilor de apă supuse experiențelor

Nr. crt.	Data recolt.	Locul recolt.	Culoare, miros	pH	CCO mg/l	CN^- mg/l	ACN mg/l	Reziduu sec g/l
1	3.II.1970	turn de control	Brun, roșcat, miros de cianuri	6,5	40 000	467	2 083	—
2	12.V.1970	rezervor 307	,, ,,	7	7 784	120	485,5	—
3	10.VII.1970	,,	,, ,,	7	—	270	413,7	—
4	20.VIII.1970	,,	,, ,,	4	11 067	194	828	—
5	9.X.1970	,,	,, ,,	5,5	24 000	223	165	—
6	14.I.1971	,,	,, ,,	5,8	6 181	91	364	—
7	14.IV.1971	,,	,, ,,	5,5	31 152	221	220	60
8	28.V.1971	,,	,, ,,	4,5	29 190	416	200	49,3

CCO = consum chimic de oxigen
CN^- = ioni cian
ACN = acrilonitrili

Astfel, ionul CN^- se găsește în concentrații de 91 la 467 mg/l; ACN de la 165 la 2083 mg/l; CCO variază între 6 181 și 40 000 mg O_2/l.

Adaptarea microflorei din nămolul activ la cantități crescînde de toxic, ca și metabolizarea acestuia, apar în datele cuprinse în tabela 2.

Tabela 2

Variația concentrației în ioni CN^-, ACN și CCO în apa reziduală artificială, în funcție de adaptarea microflorei

Nr. crt.	CN^- inițial mg/l	CN^- final mg/l	ACN inițial mg/l	ACN final mg/l	CCO inițial mgO_2/l	CCO final mgO_2/l	Microflora nămolului activ
1	8	0,15	40	2,6	1 000	280	amoebe, bacterii diverse
2	12	0,26	40	0	1 000	520	,,
3	24	0,156	100	0	1 000	560	,,
4	30	0,26	100	0	1 000	200	,,
5	32	1,04	100	0	1 000	80	,,

CN^- = ioni cian
ACN = acrilonitrili
CCO = consum chimic de oxigen

Se constată că CN^- scade de la 32 la 1,04 mg/l, ACN de la 100 la 0 și CCO de la 1 000 la 80 mg O_2/l.

Deși în cazul folosirii apei reziduale artificiale adaptarea microflorei este evidentă, totuși apa reziduală industrială a avut un efect nociv asupra nămolului activ, chiar la concentrații mai mici ale ionului CN^- decît cele folosite în cazul apei de alimentare artificială, așa cum se vede în tabela 3.

Se poate observa că, după 80 de ore de contact în condițiile experimentale descrise, concentrația în CN^- a scăzut de la 10 la 3,25 mg/l (martorul arată însă că aceasta s-a datorat aerării), iar CCO a rămas practic neschimbat (1000 față de 998 mg), ceea ce denotă pierderea capacității de metabolizare a substanțelor oxidabile din apă.

Tabela 3

Variația concentrației în ioni CN^- și ACN în apa reziduală și martor (lotul nr.1)

Nr. ore de alimentare cu apă reziduală Pitești	Conc. de CN^- (mg/l)				CCO (mg O_2/l)			
	inițial		final		inițial		final	
	probă	martor	probă	martor	probă	martor	probă	martor
20	10	10	1,5	4	1 000	—	827	—
40	10	10	2,7	4	1 000	—	1 000	—
60	10	10	3,25	4	1 000	—	977	—
80	10	10	3,25	3,64	1 000	—	998	—

Martor — apă reziduală fără nămol activ aerată în aceleași condiții cu proba.
CN^- = ioni cian
CCO = consum chimic de oxigen

Tabela 4

Variația concentrației componenților apei din diverse loturi și influența asupra microflorei

Nr. lot.	Conc. inițial CN^- (mg/l)	Conc. finală CN^- (mg/l)	CCO inițial (mgO_2/l)	CCO final (mgO_2/l)	Aspectul microscopic al nămolului
1	2,5	1,4	1 160	782	foarte rare amoebe
	3,1	1,3	1 200	500	,, ,, ,,
	10	3,25	1 000	998	dispariția protozoarelor
2	6	0,747	1 000	116	numeroase amoebe
	12	5,98	1 000	776	dispariția amoebelor
3	1	0,9	—	—	amoebe, ciliate
	4	1,859	1 000	800	dispariția protozoarelor
	10	9,893	1 000	900	dispariția protozoarelor și dezagregarea flocoanelor de nămol
4	2	1,1	1 000	280	ciliate
	3	0,65	800	419	dispariția ciliatelor
5	1	1	600	76	dispariția protozoarelor
	3	3	800	800	dezagregarea flocoanelor de nămol activ

CN^- = ioni cian
CCO = consum chimic de oxigen

Rezultatele grupate în tabela 4 arată că toate loturile de apă reziduală industrială au prezentat o acțiune toxică puternică asupra microflorei nămolului activ, deși s-a făcut adaptarea prealabilă la KCN și ACN. Deoarece această acțiune toxică s-a manifestat la concentrații de ion cian inferioare celor introduse în apa reziduală artificială, a fost necesară verificarea capacității microorganismelor din cultura de nămol activ utilizată în experiență de a metaboliza ionul cian. Pentru aceasta, în locul apei reziduale Pitești, s-a introdus în vasul de cultivare o apă reziduală artificială cu același CCO/l, impurificată cu KCN într-o concentrație echivalentă la 40 mg CN^-/l. Paralel s-a introdus în experiență un vas

martor, în care o apă reziduală artificială cu aceeaşi compoziţie a fost aerată în lipsa nămolului activ.

După 20 de ore de contact, concentraţia ionilor cian a scăzut de la 40 la 1,98 mg/l, iar în vasul martor oxidarea prin aerare a scăzut concentraţia ionilor CN^- de la 40 la 8,3 mg/l.

Experienţa aceasta dovedeşte că nămolul activ posedă echipamentul enzimatic necesar metabolizării complete a ionului cian. Acţiunea toxică a apei reziduale industriale asupra culturii de nămol activ se datoreşte, probabil, nu atît concentraţiei de cianură şi acrilonitril din apă, cît polimerilor organici cu molecule mari aflaţi în cantităţi însemnate în această apă. CCO mare al loturilor de apă studiate, precum şi reziduul sec de 40—60 g/l, reflectă prezenţa în apa reziduală a unor cantităţi mari de substanţe organice, în afară de cianură şi acrilonitril.

În sprijinul acestei ipoteze vin o serie de experienţe efectuate în laboratorul nostru, prin care s-a căutat îndepărtarea din apa reziduală a polimerilor grei, utilizînd diferite materiale adsorbante ca: pămînt adsorbant, cocs de fluidizare sau preparatul „S”*.

Apa tratată cu 0,25 ml preparat „S” %, în două repetiţii, faţă de apa reziduală netratată, dar diluată pînă la aceeaşi concentraţie de CN^- mg/l, nu a avut efect toxic asupra microflorei unei culturi de nămol activ. Protozoarele şi bacteriile şi-au păstrat viabilitatea după ce au fost menţinute timp de 18 ore în contact cu apa reziduală tratată cu produsul „S”, deşi după tratament apa mai conţinea 130 mg CN^-/l, pe cînd apa reziduală netratată, diluată pînă la concentraţia de 130 mg CN^-/l, a avut un efect toxic letal asupra microorganismelor din nămolul activ.

Rezultă deci că acţiunea toxică a apei reziduale provenite de la instalaţia de sinteză a acrilonitrilului se datoreşte nu numai ionilor cian şi acrilonitrilului, ci în special polimerilor grei ai nitrililor organici.

CONCLUZII

a. — Încercările din prezenta lucrare de a îndepărta impurificatorii organici din apele reziduale provenite de la sinteza acrilonitrilului prin oxidare biologică directă cu ajutorul unei microflore adaptate la cianuri şi acrilonitrili nu au dat rezultate satisfăcătoare nici în cazul cînd concentraţia acestor ape în ioni cian a fost redusă, prin diluare, la 3—10 mg CN^-/l.

b. — Se obţin însă rezultate bune dacă oxidarea biologică este precedată de un tratament fizico-chimic al apelor reziduale (adsorbţie, oxidare cu agenţi chimici etc.), urmat sau nu şi de diluare.

Prezentat la redacţie la
20 septembrie 1972

Institutul de cercetări chimico-farmaceutice, Bucureşti

* Preparatul „S” a fost realizat în I.C.C.F. de un alt colectiv şi brevetat. Acest produs conţine un tensioactiv puternic.

BIBLIOGRAFIE

1. M. I. Dolin, în *The bacteria*, vol. II, ed. I. C. Gunsalus şi R. Y. Stamer, Academic Press, London-New York, 1961, p. 346.
2. Tetsuo Oka, Koso Kagaku Symposium, Univ. Tokyo, **17**, 82, 1962.
3. H. Liebmann, *Handbuch der Frischwasser und Abwasserbiologie*, K. Oldenburg, München, 1951.
4. O. Jubermann, G. Krause, Chem. Ing. Techn., **40**, 288, 1968.
5. E. Schulek, Z. Ang. Chem., **62**, 337, 1923.
6. T. Ionescu, S. Constantinescu, G. Marcoci, M. Motoc, I. Petre, *Analiza apelor*, Edit. tehnică, Bucureşti, 1968, p. 77.
7. F. Albert, N. Bărbulescu, C. Greff, *Analiza chimică organică*, ed. a II-a, Editura tehnică, Bucureşti, 1970, p. 396.

ON THE BIOLOGICAL OXIDATION OF SOME ORGANIC WASTES IN WASTE WATERS FROM THE ACRYLONITRILE SYNTHESIS

SUMMARY

The waste water from an acrylonitrile plant, containing hydrocyanic acid, sodium cyanide, acetonitrile, propionitrile, acrylonitrile, ammonium sulphate, acetone, acetic aldehyde and polymerized acrylo- and propionitriles, were treated in a laboratory equipment for activated sludge cultivation with discontinuous feeding.

The activated sludge was acclimatized to a concentration of 32 mg CN^-l/ and was able to oxidize the cyanide up to a concentration of 1.04 mg CN^-/l.

However, this activated sludge was strongly inhibited by the waste water, its capacity to oxidate organic compounds decreased, and its capacity to oxidate cyanide was lost.

The inhibitory effect of the studied waste water was induced by the very high concentrations of organic cyanide (100 mg CN^-/l to 400 mg CN^-/l) and acrylo- and propionitrile polymers.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 2, 203–207 (1973)

CONJUGATE ALE AGAROZEI CU FACTORI AI SISTEMULUI ENZIMATIC PLASMINOGEN-PLASMINĂ

HORST D. SCHELL şi FLORICA IONESCU-STOIAN

Rezumat. — Prin cuplarea plasminogenului uman şi a streptokinazei într-o soluţie de $NaHCO_3$ 0,1 M , la 4°C, cu agaroza activată prin tratare cu BrCN, s-au obţinut preparate insolubile de proenzimă şi activator care şi-au păstrat proprietăţile lor catalitice specifice. În plus, preparatele insolubile prezintă şi unele proprietăţi noi. Astfel, plasmina insolubilă rezultată din activarea cu streptokinază a plasminogenului insolubil nu se mai degradează în cursul reacţiei enzimatice în urma procesului de autoproteoliză şi poate fi refolosită. Iar streptokinaza insolubilă, spre deosebire de cea liberă, neconjugată, poate activa şi plasminogenul bovin, care în mod normal este refractar la activarea cu streptokinază liberă. Conjugatul agaroză-streptokinază poate fi folosit ca suport în purificarea selectivă a plasminogenului prin cromatografie de afinitate.

Legarea chimică a enzimelor şi a altor molecule biologic active de suporturi insolubile, cu păstrarea nealterată a proprietăţilor lor biologice specifice, a găsit în ultimii ani un interes tot mai mare nu numai în cercetarea ştiinţifică şi în clinica medicală, dar şi în diferitele ramuri ale practicii industriale. Principalul avantaj al acestor „enzime insolubile" constă în posibilitatea refolosirii lor repetate [1], [2], [3]. După terminarea reacţiei, ele pot fi uşor separate din amestecul de reacţie prin simplă filtrare sau centrifugare şi folosite din nou după o prealabilă spălare. S-a putut constata, totodată, că aceşti derivaţi insolubili sînt mai stabili în soluţii apoase decît enzimele native corespunzătoare [4] şi mai puţin sensibili la variaţii de pH şi de temperatură [5], [6].

Dintre suporturile insolubile folosite în prezent pentru fixarea mai ales a proteinelor şi peptidelor biologic active, s-a dovedit foarte util gelul perlat de agaroză, care posedă o suprafaţă mare de contact, o bună permeabilitate, o stabilitate mecanică remarcabilă şi nu-şi schimbă proprietăţile sale fizico-chimice şi mecanice în cursul procesului de activare şi cuplare.

Procesul de fixare a moleculelor biologic active de agaroză perlată comportă două faze simple, şi anume : activarea agarozei cu BrCN, care are drept scop introducerea de grupări—CN în molecula acestui polizaharid, urmată apoi de cuplarea proteinei de agaroza activată, care este un proces atît de blînd, încît nu se repercutează asupra proprietăţilor biologice ale moleculei cuplate.

Reacţiile chimice care au loc în cursul procesului de activare cu BrCN a unui polimer polizaharidic şi apoi la cuplarea proteinei de polimerul activat, au fost studiate de Axén şi colab. [7] în cazul dextranului legat încrucişat (Sephadex) (fig. 1). Este foarte probabil ca aceleaşi reacţii să aibă loc şi în cazul altor polizaharide şi polimeri polihidroxilici. În cazul agarozei, care nu dispune de două grupări hidroxilice vicinale, reacţia s-ar putea deosebi întrucîtva de cea imaginată de Axén şi Ernback [8].

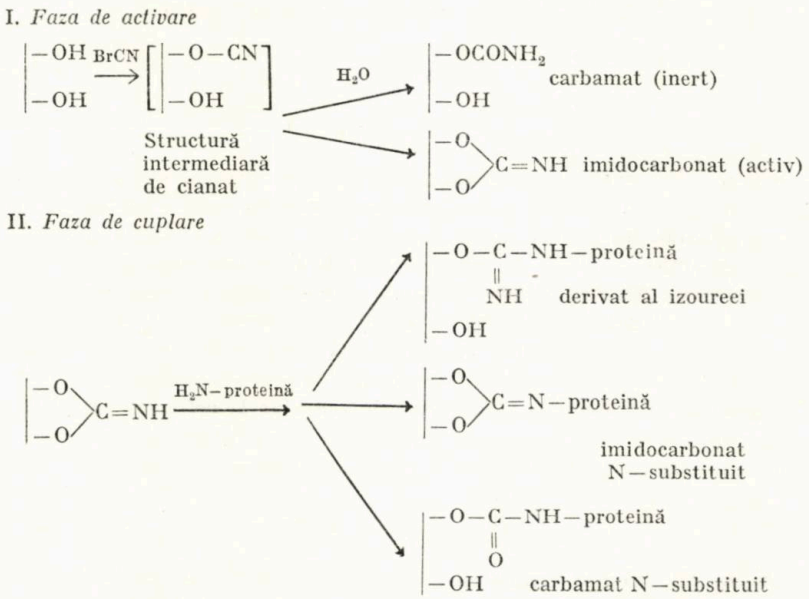


Fig. 1. — Schema reacţiei de activare a polizaharidelor cu BrCN şi a cuplării lor cu proteinele.

În lucrarea de faţă se prezintă modul de obţinere şi cîteva din proprietăţile preparatelor insolubile rezultate din cuplarea plasminogenului uman şi a streptokinazei cu agaroză perlată şi sînt discutate posibilităţile şi perspectivele de cercetare pe care le deschide acest sistem de proenzimă insolubilă şi activator insolubil. Activităţile catalitice ale preparatelor insolubile sînt comparate cu activităţile preparatelor libere.

MATERIAL ŞI METODE

Agaroza transformată mai întîi într-un gel perlat, după indicaţiile lui Hjertén [9] (concentraţia gelului 6%, mărimea particulelor 50—100 mesh), a fost apoi activată cu BrCN după Axén şi colab. [7], [8] şi cuplată fie cu plasminogen uman, fie cu streptokinază. La cuplarea plasminogenului şi a streptokinazei s-au respectat, în general, condiţiile folosite de Porath şi colab. [10] şi Axén şi Ernback [8] la cuplarea altor molecule biologic active de agaroză activată. În cazul plasminogenului s-a procedat astfel: 25 ml gel perlat de agaroză activată depus se tratează cu 11 mg plasminogen uman purificat, cuprins în 20 ml soluţie de $NaHCO_3$ 0,1 M,

şi se agită peste noapte, electromagnetic, la 4°C. Conjugatul rezultat este apoi spălat pe o pîlnie Büchner cu tampon fosfat 0,1 M, pH 7,4, apoi cu tampon glicocol 0,1 M, pH 3,4, care conţine şi 0,15 M NaCl, apoi din nou cu tampon fosfat, respectînd timpul de spălare indicat de autorii mai sus citaţi. Produsul final este păstrat, pînă la folosire, în tampon fosfat la 4°C. În cazul streptokinazei s-a procedat în mod similar, tratînd însă cei 25 ml de gel perlat de agaroză activată depus cu 40 mg streptokinază (Kabi, Suedia) cuprinsă în 20 ml $NaHCO_3$ 0,1 M.

Activitatea cazeinolitică a plasminogenului liber şi a plasminogenului insolubilizat prin cuplare cu agaroză, în prezenţa şi absenţa streptokinazei, a fost determinată după metoda lui Remmert şi Cohen [11], modificată de Alkjaersig şi colab. [12], iar cea fibrinolitică după Loomis şi colab. [13].

Analiza activităţii de activator a streptokinazei libere şi conjugate asupra plasminogenului uman şi bovin a fost efectuată după Ionescu-Stoian şi colab. [15].

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Prin activarea cu streptokinază sau chiar prin autoactivare, proenzima plasminogen trece, după cum se ştie, în enzima propriu-zisă plasmină. În figura 2 sînt redate activităţile cazeinolitice, în funcţie de timp, ale plasminogenului solubil, necuplat (I), şi ale plasminogenului insolubilizat, prin cuplare cu agaroză activată, în prezenţa (II) şi absenţa (III) streptokinazei. După cum rezultă din această figură, activitatea cazeinolitică a plasminogenului conjugat (II) creşte progresiv cu timpul, atingînd maximul după aproximativ 4 ore, apoi plafonîndu-se. O oarecare reducere a activităţii catalitice a plasminogenului cuplat, faţă de cel liber, se datoreşte, probabil, unor împiedicări sterice [15]—[19] condiţionate de suportul insolubil şi este un fenomen cunoscut şi des constatat şi în cazul altor enzime cuplate de polimeri insolubili [20], [21]. A III-a curbă

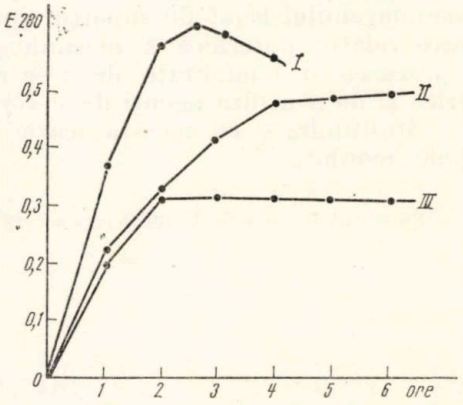


Fig. 2. — Activitatea cazeinolitică a plasminogenului liber (I) şi a preparatelor de plasminogen insolubil în prezenţa (II) şi absenţa (III) streptokinazei.

reprezintă activitatea plasminogenului insolubil autoactivat în cursul incubării, deci în absenţa streptokinazei. Capacitatea de autoactivare a plasminogenului este păstrată deci şi în formă conjugată, fapt care a fost confirmat şi cu ocazia determinării activităţii fibrinolitice.

Plasminogenul conjugat şi activat fie prin prezenţa streptokinazei, fie prin autoactivare, poate fi reutilizat după ce a fost izolat din mediul de reacţie prin filtrare sau centrifugare şi spălat de mai multe ori cu o soluţie tampon de fosfat deoarece îşi păstrează activitatea catalitică practic nemodificată şi nu se degradează în cursul reacţiei enzimatice prin autoproteoliză cum se întîmplă în cazul plasminei necuplate (fig. 2, curba I). Rezistenţa aceasta faţă de autodigestie, care apare ca o proprietate nouă a plasminei cînd se află în stare cuplată, a fost semnalată şi în cazul altor enzime proteolitice legate de suporturi insolubile [22].

Prin cuplarea streptokinazei cu agaroză perlată şi activată se obţine de asemenea un preparat insolubil activ, în care streptokinaza îşi păstrează intactă proprietatea ei de activator al plasminogenului uman. Capacitatea de activare a streptokinazei legate este practic identică cu aceea a streptokinazei libere nelegate, dar apare şi în acest caz o proprietate nouă: streptokinaza în stare conjugată poate activa, în plus, şi plasminogenul bovin, care în mod normal este refractar la activarea cu streptokinază liberă. Este cunoscut faptul că streptokinaza poate activa plasminogenul bovin numai în combinaţie cu plasminogenul uman, căruia i se atribuie proprietăţi de proactivator al plasminogenului bovin, în anumite raporturi molare [14].

Această comportare deosebită şi neaşteptată a streptokinazei conjugate este în curs de cercetare.

Streptokinaza conjugată poate fi folosită nu numai ca activator insolubilizat al plasminogenului, dar şi ca suport în cromatografie de afinitate pentru purificarea selectivă a plasminogenului. Astfel, trecînd, de pildă, soluţia unui preparat brut de plasminogen printr-o coloană încărcată cu conjugatul agaroză-streptokinază, din amestecul complex de proteine va fi reţinut selectiv doar plasminogenul de activatorul lui. În urma desorbţiei se obţine un plasminogen cu un înalt grad de puritate, catalitic activ, cînd este transformat în forma sa de enzimă. Randamentul este însă scăzut. Acest fapt poate fi explicat pe de o parte prin existenţa unor împiedicări sterice, care se repercutează negativ asupra cantităţii plasminogenului legat de suportul specific, iar pe de altă parte printr-o legare relativ puternică a plasminogenului de conjugat. Va trebui să se găsească o modalitate de a se reduce pe cît posibil împiedicările sterice şi de a utiliza agenţi de desorbţie mai puternici.

Mulţumim şi cu această ocazie biologului A. Popa pentru ajutorul tehnic acordat.

Prezentat la redacţie la 30 decembrie 1972

Institutul de biochimie,
Institutul „Dr. I. Cantacuzino",
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. I. H. Silman, E. Katchalski, Annu. Rev. Biochem., **35**, 873 (1965).
2. H. H. Weetall, Science, **166**, 615 (1969).
3. F. Friedberg, Chromatogr. Rev., **14**, 121 (1971).
4. T. M. S. Chang, Science Toole, **16**, 34 (1969).

5. M. D. Lilly, A. K. Sharp, The Chemical Engineer, **215**, 12 (1968).
6. R. Axén, E. Heilbronn, A. Winter, Biochim. biophys. Acta, **191**, 478 (1969).
7. R. Axén, J. Porath, S. Ernback, Nature, **214**, 1302 (1967).
8. R. Axén, S. Ernback, Eur. J. Biochem., **18**, 351 (1971).
9. S. Hjertén, Biochim. biophys. Acta, **79**, 393 (1964).
10. J. Porath, R Axén, S Ernback, Nature, **215**, 1491 (1967).
11. L. F. Remmert, P. P. Cohen, J. biol. Chem., **181**, 431 (1949).
12. N. Alkjaersig, A. P. Fletcher, S. Sherry, J. biol. Chem., **234**, 832 (1959); J. clin. Invest., **28**, 1086 (1959).
13. R. C. Loomis, C. J. Charles, A. Rider, Arch. Biochem. Biophys., **12**, 1 (1947).
14. F. Ionescu-Stoian, N. Bonciocat, M. Hurduc, *Symposium on Pharmaceutical Enzymes and their Assay* , Universitair Pers, Ghent, Belgium, 1969, p. 59.
15. A. Bar-Eli, E. Katchalski, J. biol. Chem., **238**, 1690 (1963).
16. A.F.S.A. Habbeeb, Arch. Biochem. Biophys., **119**, 264 (1967).
17. R. J. H. Wilson, G. Kay, M. D. Lilly, Biochem. J., **108**, 845 (1968).
18. W. M. Ledingham, W. E. Hornby, FEBS Lett., **5**, 118 (1969).
19. W. E. Hornby, M. D. Lilly, E. M. Crook, Biochem. J., **98**, 420 (1966).
20. M. A. Mitz, L. J. Summaria, Nature, **189**, 576 (1961).
21. G. Manecke, S. Singer, Macromol. Chem., **37**, 119; **39**, 13 (1960).
22. D. Gabel, B. v. Hofsten, Eur. J. Biochem., **15**, 410 (1970).

AGAROSE CONJUGATES WITH SOME FACTORS OF THE PLASMINOGEN-PLASMINE ENZYME SYSTEM

SUMMARY

Some insoluble proenzyme and activator preparations have been obtained by coupling human plasminogen and streptokinase in 0.1 M $NaHCO_3$ at +4°C with BrCN-activated agarose which preserve their specific catalytic properties. Besides the insoluble preparations also display some new properties. Thus, the insoluble plasmine, obtained after the activation of the insoluble plasminogen with streptokinase, is no longer broken down during enzyme reaction following the selfproteolysis process and can be used again. In contrast with the free non-conjugated streptokinase, the insoluble one is also able to activate bovine plasminogen, usually refractory to activation with free streptokinase. The agarose-streptokinase conjugates can be used as support during the selective purification of plasminogen by affinity chromatography.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 2, 209–219 (1973)

REFERAT GENERAL

ACȚIUNEA RADIAȚIILOR IONIZANTE ASUPRA MEMBRANEI ERITROCITARE

ILCA MĂRGINEANU și RADU OLINESCU

Rezumat. — Sub acțiunea radiațiilor ionizante, membrana eritrocitară suferă multiple modificări structurale și funcționale. Scăderea concentrației tiolilor din membrană, la doze de aproximativ 50 kR, are loc datorită oxidării lor și formării punților disulfurice. La doze de aproximativ 70 kR are loc o peroxidare apreciabilă a lipidelor membranare, fenomen care este paralel cu apariția hemolizei. Perturbarea transportului începe la doze relativ mici și are la bază modificări structurale neidentificate, în care lezarea grupărilor SH are un rol hotărîtor. Transportul pasiv pare să fie cel mai direct afectat de radiațiile ionizante. În urma iradierii se intensifică activitatea compușilor antioxidanți din eritrocit și procesele fiziologice de protecție și refacere. Este propusă o schemă a înlănțuirii proceselor care, sub acțiunea radiațiilor ionizante, duc la hemoliză.

Hematia reprezintă un model avantajos de studiu al acțiunii factorilor fizici și chimici asupra unei structuri celulare omniprezente — membrana [1]—[3]. În acest sens, lezarea eritrocitului matur de către radiațiile ionizante, deși are un rol mic în sindromul de iradiere [4], [5], este un subiect mult abordat în literatura de specialitate [4], [6]—[16]. În această lucrare ne propunem să sistematizăm datele actuale, arătînd și lacunele existente în domeniul respectiv. Ne vom referi la efectele *in vitro* ale dozelor mari, folosite în studiul membranei eritrocitare, arătînd, unde este cazul, existența unor efecte similare observate la iradierea *in vivo*.

Pentru a înțelege natura modificărilor de membrană induse de iradiere, vom prezenta sumar rolul constituenților chimici ai membranei și funcția membranei eritrocitului normal.

Prezența unei structuri organizate, constînd din unități de diferite dimensiuni și conformații [17]—[23], asigură stratului proteic al membranei un rol de „sită moleculară". Prezența enzimelor membranare [24] conferă acesteia proprietăți catalitice, indispensabile îndeplinirii funcțiilor ei complexe. Extensibilitatea deosebită a unor formațiuni proteice din membrană oferă acesteia o capacitate „tampon de suprafață", deci o anumită rezistență osmotică.

Cele mai importante lipide din constituţia membranei sînt fosfolipidele şi colesterolul. Grupările polare ale fosfolipidelor realizează interacţia cu proteinele, iar catenele lungi ale acizilor graşi fac ca stratul lipidic să fie afinat, astfel explicîndu-se permeabilitatea pentru substanţe lipofobe [25]. Gradul de permeabilitate a membranei depinde de natura acizilor graşi şi de numărul şi localizarea legăturilor nesaturate [26], [27]. Colesterolul are un efect de stabilizare şi condensare a lipidelor din membrană (28).

Membrana eritrocitară are rolul de a asigura în interiorul acestuia o compoziţie ionică bine determinată şi constantă, necesară atît menţinerii diferiţilor compuşi, în primul rînd hemoglobina, în stare funcţională, cît şi schimburilor eficiente de gaze. Această stare staţionară, care se realizează prin activitatea continuă, pasivă şi activă, a membranei eritrocitare, este caracterizată printr-un puternic dezechilibru electrochimic al unor ioni (în special sodiu) de o parte şi de alta a membranei, dezechilibru menţinut pe seama activităţii metabolice (transport activ). Dezechilibrul electrochimic este însoţit de existenţa unui echilibru osmotic perfect pe cele două feţe ale membranei. Presiunea oncotică a proteinelor eritrocitare este compensată în mare măsură de excesul de ioni de sodiu din plasmă.

1. MODIFICĂRILE BIOCHIMICE PRODUSE DE RADIAŢIILE IONIZANTE LA NIVELUL MEMBRANEI ERITROCITARE

Hemoliza, consecinţa finală (în cazul extrem) a acţiunii radiaţiilor ionizante asupra eritrocitului, are ca substrat modificările biofizice şi biochimice care au loc în eritrocit, şi în special la nivelul membranei acestuia, modificări care se succedă într-o anumită ordine cauzală. Succesiunea variaţii chimice — modificări ale permeabilităţii este valabilă şi în cazul în care s-au putut evidenţia perturbări ale permeabilităţii, fără a se sesiza în paralel efecte biochimice corespunzătoare (pentru doze de iradiere *in vitro* de ordinul 100 R) [7].

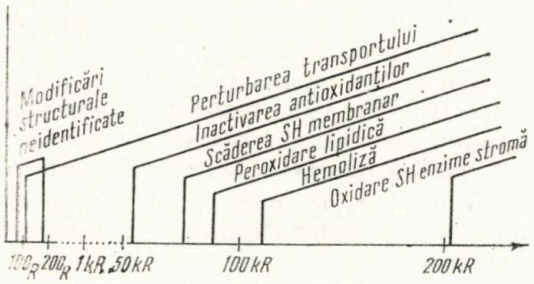


Fig. 1. — Dependenţa efectelor biochimice şi a transportului prin membrana eritrocitului de doza de iradiere.

Principalele modificări biochimice la nivelul membranei datorate acţiunii radiaţiilor ionizante asupra eritrocitului sînt perturbarea echilibrului dintre grupările —SH şi —S—S, apariţia peroxizilor lipidici, scăderea capacităţii oxidante a antioxidanţilor naturali. În figura 1 este schematizată dependenţa principalelor efecte biochimice şi a transportului de doza de iradiere a eritrocitului.

a. Perturbarea echilibrului $-SH \rightleftharpoons -S-S-$

Importanța grupărilor $-SH$ și $-S-S-$ în membrana eritrocitară este cunoscută din punct de vedere fenomenologic, fără însă a se fi înțeles încă nici mecanismele prin care aceste grupări sînt implicate în procesele de permeabilitate, nici mecanismele prin care lezarea acestor grupări sub acțiunea diferiților factori determină lezarea permeabilității [29].

Importanța structurală a grupărilor tiolice ($-SH$) din membrană constă în caracterul de stabilitate dinamică pe care-l conferă acesteia, prin posibilitatea stabilizării și labilizării structurii terțiare a proteinelor, pe seama mobilității reacției $-SH \rightleftharpoons -S-S-$. Din punct de vedere funcțional, grupările tiolice din proteinele membranare sînt esențiale pentru activitatea catalitică a enzimelor; grupările $-SH$ din moleculele cu greutate moleculară mică joacă un rol protector asupra $-SH$ proteic. Acest rol se manifestă permanent în condițiile activității celulare [30], [31], prin care grupările $-SH$ proteice tind să se oxideze, și este mult amplificat în condițiile unui potențial oxidant crescut, așa cum este în cazul iradierii. În acest caz compușii cu $-SH$ capătă un important rol radioprotector.

Sub acțiunea radiațiilor ionizante au loc în general atît reacții de oxidare a $-SH$, cît și de reducere a $-S-S-$, în funcție de potențialul oxidant al mediului și de structura speciei chimice considerate. În general sînt mai oxidabili tiolii mici decît cei proteici [32], aceasta constituind una din premisele fizico-chimice ale protecției prin compuși cu $-SH$.

Scăderea concentrației tiolilor membranari este unul din efectele biochimice cele mai nete observate în urma iradierii eritrocitelor sau fantomelor eritrocitare [6]—[9], [11]—[13], [15]. Acest efect este manifest la doze de iradiere de peste 50 kR. Ipotezele lui Sutherland și Pihl [12], [13] legate de această problemă constituie astăzi concluzii aproape definitive. Se pare că, din totalul tiolilor membranari, doar 10% au o radiosensibilitate accentuată, restul de 90% fiind mult mai puțin radiosensibili. Anumiți factori care alterează structura membranei cresc procentul grupărilor tiolice radiosensibile. Scăderea numărului de grupări $-SH$ în urma iradierii se datorește formării de grupări $-S-S-$, fapt confirmat indirect prin aceea că incubarea înainte de iradiere cu tioli simpli (mercaptoetilamina, mercaptotilguanidina) scade numărul de grupări $-SH$ care trec în $-S-S-$. Acidul paraaminobenzoic, care este un captator de radicali OH, prezintă un efect radioprotector asupra SH; aceasta demonstrează că radiațiile ionizante acționează asupra grupărilor $-SH$ din membrană printr-un efect direct. Faptul că grupările $-SH$ implicate în leziunea de iradiere sînt localizate în cadrul membranei celulare s-a dedus pe baza existenței unor efecte similare asupra permeabilității (pierderi de K, captări de Na), efecte exercitate pe de o parte de radiațiile ionizante și pe de altă parte de unii agenți blocanți ai grupărilor $-SH$, pentru care membrana este impermeabilă (paracloromercuribenzoat) sau foarte slab permeabilă (N-etilmaleimida) [11], [15], [33], [34].

Sutherland și Pihl [12], [13] arată că în condițiile unui metabolism activ, aproximativ 60% din numărul grupărilor tiolice oxidate în urma iradierii se reduc. Reducerea este mult mai accentuată în eritrocite decît

în fantomele eritrocitare. Se deduce că eritrocitele posedă un mecanism celular pentru reducerea disulfurilor induse de iradiere, în condiţiile unui metabolism activ. Pe această bază s-ar putea explica şi refacerea permeabilităţii, observată în aceste condiţii, după iradiere. Trebuie remarcat că după alţi autori refacerea permeabilităţii poate avea loc, după incubare la 37°, chiar în condiţii în care sistemul SH-reductazic nu poate lucra, deci s-ar părea că refacerea este legată de „repararea" altei leziuni membranare produse de iradiere, şi nu a oxidării —SH [7]. Problema nu este încă rezolvată. Refacerea, pe seama adăugării după iradiere a unor compuşi cu SH [11], se poate explica prin desfacerea de către aceştia a legăturilor mixte disulfurice, formate în urma iradierii, între tiolii membranei [33].

b. Peroxidarea lipidică şi inactivarea antioxidanţilor naturali

Atunci cînd iradierea depăşeşte un anumit prag, marea capacitate oxidantă a mediului nu mai permite revenirea stabilă a antioxidanţilor (care în mod normal oferă un ecran protector împotriva potenţialului oxidant fiziologic) la starea redusă (funcţională), ei încetînd de a-şi mai manifesta acţiunea protectoare şi astfel facilitîndu-se peroxidarea lipidică.

Sutherland şi Pihl [13] arată că în membrana eritrocitelor iradiate cu doze de peste 60 kR are loc o peroxidare lipidică apreciabilă. Această modificare biochimică se poate corela cu variaţii de permeabilitate, fragilitate osmotică, conţinut în tioli membranari etc. [9], [11], [13].

Faptul că peroxidarea lipidică începe la doze mult mai mari decît cele care produc variaţii de permeabilitate sau dispariţia grupărilor —SH radiosensibile arată că peroxidarea nu poate fi o cauză a schimbărilor de permeabilitate induse de iradiere, schimbări care sînt însă legate de lezarea grupărilor SH. Între 50 şi 400 kR Myers şi Bide [9] constată o dependenţă liniară a peroxidării şi hemolizei, în funcţie de doză. Dozele mai mici de 50 kR nu pot produce nici peroxidare, nici hemoliză. Se poate deduce că peroxidarea lipidică este una din cauzele directe ale hemolizei, la doze mari. Cantitatea de peroxizi lipidici formaţi este proporţională cu timpul de incubare după iradiere. Adăugarea de tocoferol la suspensia iradiată scade viteza de formare a peroxizilor. Deci peroxidarea lipidică este o consecinţă a reacţiei ulterioare iradierii, cu oxigenul atmosferic, spre deosebire de pierderea de antioxidant, care este o consecinţă directă a iradierii.

Deşi nu se cunoaşte mecanismul intim al lezării permeabilităţii prin peroxidare lipidică, datele existente sugerează că aceasta produce modificări structurale mai drastice şi cu caracter mai ireversibil decît modificările datorate lezării tiolilor membranari. Datorită persistenţei lor după iradiere şi multiplelor consecinţe pe care le are prezenţa lor în organism, mulţi autori înglobează peroxizii lipidici în categoria radiotoxinelor [35], [36], [37]. Acestea au ele însele o mare capacitate oxidantă, prin aceasta putînd oxida în mod secundar grupări chimice cu mare importanţă structurală şi funcţională, astfel amplificîndu-şi efectele.

Există studii referitoare la legătura dintre peroxidarea lipidică şi lezarea grupărilor tiolice. Little şi Brien [32], studiind eficienţa peroxi-

zilor lipidici în oxidarea tiolilor, constată că gruparea —SH este cea mai sensibilă din proteine la modificarea prin peroxizi.

Robinson [38] sugerează că un tip de interacțiune proteină-lipid ar putea fi acela dintre gruparea SH a proteinei și dubla legătură lipidică. Această interacție ar putea fi ușor afectată de radiațiile ionizante.

Pînă în prezent, mecanismele intime ale lezării permeabilității selective a membranei eritrocitare, fie prin lezarea grupărilor —SH, fie prin peroxidare lipidică, nu sînt cunoscute, și cu atît mai puțin legătura dintre ele.

2. PERTURBAREA TRANSPORTULUI PRIN MEMBRANA ERITROCITARĂ, ÎN URMA IRADIERII

Unul din efectele precoce ale radiațiilor ionizante asupra membranei eritrocitare este dereglarea echilibrului ionic: se constată un eflux de potasiu și un influx de sodiu, ca și cum cei doi ioni ar migra în virtutea gradienților electrochimici. Aceste efecte se întîlnesc și la doze mici [7], la care nu se observă lezarea compușilor tiolici, apariția peroxizilor lipidici sau hemoliza.

Unii autori [4], [6] susțin, pe baza iradierii eritrocitelor cu doze de aproximativ 2 kR, că variațiile de permeabilitate în urma iradierii se datoresc inhibării transportului activ. Mulți autori aduc contraargumente împotriva acestei concluzii. Myers și Bide [9] arată că dereglările sînt maxime la temperaturi mici, la care transportul activ este inhibat. Ouabaina, inhibitor selectiv al transportului activ, nu are nici un efect asupra nivelului potasiului în eritrocite iradiate și incubate la 37°C. Autorii deduc că variațiile de concentrație a sodiului și potasiului în urma iradierii se datoresc perturbării fluxurilor pasive, concluzii confirmate ulterior de mulți autori.

Se constată că dacă după iradiere eritrocitele sînt incubate la 37°C, consecințele iradierii sînt mult diminuate [9]. Refacerea este oprită de inhibitori metabolici, deci este datorată intensificării transportului activ după iradiere, care tinde să „repare" consecințele iradierii în ceea ce privește fluxurile pasive.

Locul lezării permeabilității este o porțiune internă a membranei eritrocitare; aceasta se poate afirma pe baza faptului că GSH (rămîne la suprafața membranei), adăugat după iradiere, exercită un efect protector asupra hemolizei, dar nu și asupra pierderii de K după iradiere.

În legătură cu mecanismul posibil al lezării permeabilității în urma iradierii eritrocitelor se pot spune următoarele. Pierderea de K (sau cîștigul de Na) precedă fragilitatea osmotică crescută datorată iradierii, deci nu poate fi o urmare a acesteia, ci are cauze mai direct legate de iradiere. Pierderea nu este afectată de adăugarea de captatori de radicali liberi la fluidul extracelular, deci nu se datorește prezenței radicalilor liberi la exteriorul membranei, ci unei leziuni directe în interiorul membranei celulare. Pierderea de potasiu începe la doze de iradiere foarte mici și este susceptibilă de refacere; aceasta înseamnă că ea implică o leziune neidentificată și reparabilă, care nu poate fi pusă pe seama pierderii de glutation, a antioxidanților, a peroxidării sau a creșterii fragilității osmotice.

Toate datele din literatură pledează pentru strînsă legătură dintre pierderea de potasiu (sau cîştigul de sodiu) şi lezarea grupărilor —SH în urma iradierii [14]. O pierdere de 4% din grupările tiolice membranare poate cauza variaţii semnificative de permeabilitate pentru sodiu şi potasiu. Captatorii de radicali liberi care pătrund adînc în membrana eritrocitară au un efect paralel în ceea ce priveşte reducerea pierderii de grupări tiolice şi a fluxului de potasiu în urma iradierii [13]. Procentul de grupări —SH radiosensibile coincide cu procentul care influenţează permeabilitatea pentru cationi. Deci nu este întîmplător faptul că dozele care determină lezarea permeabilităţii produc pierderi ale unei părţi apreciabile din grupările —SH radiosensibile.

În urma iradierii eritrocitelor începînd cu doze foarte mici, între 25—100 R, Kankura şi colaboratorii [7] constată o captare de sodiu proporţională cu doza, independentă de nivelul ATP, datorată lezării grupărilor sulfhidrilice. Prin incubare la 37°C se observă o refacere independentă de nivelul ATP, deci de natură nemetabolică. Refacerea are loc chiar cînd sistemul SH-reductazic nu este activ, deci ea nu constă în reducerea tiolilor oxidaţi prin iradiere, ci se bazează pe rearanjarea macromoleculelor din membrană, prin procese dependente de temperatură, la 37°C.

Legătura dintre scăderea concentraţiei grupărilor —SH şi lezarea permeabilităţii în urma iradierii arată că grupările —SH sînt o ţintă majoră în alterarea prin iradiere a permeabilităţii. Faptul că pentru o scară foarte mare de doze de iradiere nu este alterată decît permeabilitatea pentru sodiu şi potasiu, permeabilitatea pentru alţi ioni rămînînd neschimbată [11], demonstrează că lezarea constă într-o variaţie chimică foarte specifică în membrană şi nu pur şi simplu în producerea unei „găuri" în aceasta. Natura acestei variaţii chimice şi consecinţele ei structurale nu sînt încă cunoscute.

3. MECANISMELE DE RADIOPROTECŢIE ALE ERITROCITULUI

Menţinerea hemoglobinei în stare funcţională (redusă), necesitate indispensabilă transportului eficient al oxigenului, este condiţionată de păstrarea constantă a unor parametri biochimici, care se realizează pe baza interacţiunilor schematizate în figura 2.

Perturbarea oricăruia din aceste procese poate duce la modificări care în final concură la hemoliză sau la sechestrare splenică, deci la anularea funcţiei eritrocitului.

O consecinţă a acţiunii factorilor oxidanţi asupra hemoglobinei este producerea de methemoglobină. În afară de protecţia fiziologică a hemoglobinei împotriva oxidării fierului (la care iau parte în special catalaza, glutation-peroxidaza şi anumiţi compuşi cu —SH, ca ergotioneina), eritrocitul dispune de sisteme fiziologice de reducere a methemoglobinei odată formate, pe seama energiei metabolice, prin intermediul NADH şi NADPH.

Altă consecinţă a acţiunii factorilor oxidanţi, bazată pe precipitabilitatea crescută a globinei, poate fi formarea corpilor Heinz sau a pre-

cursorilor lor, care induc variații de permeabilitate a membranei eritrocitare prin atașarea lor la tiolii membranari, cu care formează legături mixte disulfurice [39], [40], determinînd astfel creșterea sensibilității membranei. În mod fiziologic, această creștere a sensibilității, datorată îmbătrînirii, este sesizată prin mecanisme încă neelucidate de către

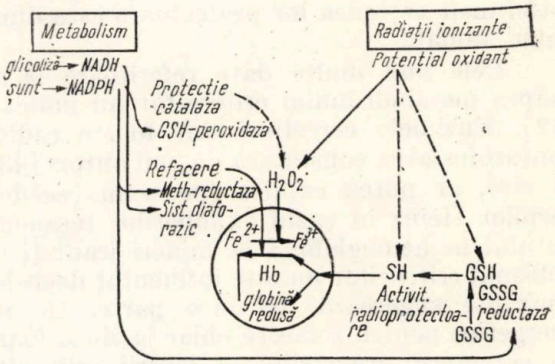


Fig. 2. — Protecția și refacerea eritrocitului. Săgețile pline reprezintă creșterea „produsului de reacție", iar săgețile punctate scăderea „produsului de reacție".

splină. În cazul iradierii, eventuala formare a corpilor Heinz sau a precursorilor lor poate potența sau amplifica efectul direct al radiațiilor asupra membranei eritrocitare.

Modul de reacție al hematiei la acțiunea factorilor oxidanți este nespecific, atît în privința efectelor acestora, cît și legat de neutralizarea lor. Un exemplu îl constituie similitudinea de acțiune a vitaminei K_3 [41] și a radiațiilor ionizante asupra hemoglobinei.

În urma iradierii intră în funcție, cu o amplitudine și eficiență determinate de nivelul de iradiere, aceleași mecanisme de protecție care acționează și în mod fiziologic. Utilizarea energiei metabolice pentru refacere explică tendința de intensificare a metabolismului în urma iradierii.

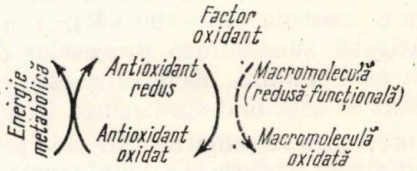


Fig. 3. — Funcționarea antioxidanților. Săgeata punctată reprezintă reacție nefavorizată energetic.

În afară de acțiunea factorilor care concură la micșorarea potențialului oxidant (catalaza, glutation-peroxidaza), un rol însemnat în radioprotecție îl joacă compușii antioxidanți (tocoferol, GSH, acid ascorbic), a căror funcționare se bazează pe următoarele principii:

1. Oxidarea antioxidanților naturali este competitivă și favorizată energetic față de oxidarea macromoleculelor biologice cu importanță funcțională (fig. 3). De aceea, în iradiere, tiolii mici și antioxidanții de tipul tocoferolului sînt afectați la doze mai mici decît proteinele cu —SH sau acizii grași nesaturați.

2. Oxidarea antioxidanţilor naturali, spre deosebire de oxidarea macromoleculelor funcţionale, este reversibilă; ei îşi pot reface permanent (în anumite limite) capacitatea antioxidantă, pe seama energiei metabolice (fig. 3).

În urma iradierii, marea capacitate oxidantă a mediului nu mai permite revenirea stabilă a antioxidanţilor la starea redusă (funcţională), astfel încît acţiunea lor protectoare este diminuată sau, la anumite doze, chiar anulată.

Cele mai multe date referitoare la acţiunea radiaţiilor ionizante asupra metabolismului eritrocitar nu indică influenţe semnificative [10], [42]. Enzimele cercetate sînt foarte radiorezistente. Inhibiţia ciclului pentozofosfatic, constatată de unii autori [43] la cîteva zile după iradierea *in vivo*, ar putea explica (pe seama scăderii nivelului GSH) formarea corpilor Heinz în cazul expunerilor terapeutice [44] sau scăderea conţinutului în hemoglobină la mineri iradiaţi cronic [45]. Faptul că metabolismul eritrocitar nu este influenţat decît la doze foarte mari de radiaţii ionizante sugerează, pe de o parte, că eritrocitul dispune de resurse energetice pentru refacere chiar la doze foarte mari, iar pe de altă parte că caracterul ireversibil al lezării eritrocitare sub acţiunea radiaţiilor ionizante la doze mari se datoreşte nu influenţării metabolismului, ci lezării membranei hematiei.

Protecţia membranei eritrocitare împotriva iradierii este bazată pe prezenţa compuşilor antioxidanţi din membrană, iar refacerea are la bază atît intensificarea metabolismului, cît şi o refacere pur structurală a membranei, independentă de metabolism, ale cărei mecanisme nu sînt cunoscute, dar care par să implice rearanjarea macromoleculelor din membrană, tinzînd către conformaţia normală, cu un maxim de eficienţă la 37°C [7].

4. MECANISMUL HEMOLIZEI INDUSE DE RADIAŢIILE IONIZANTE

Dacă doza de iradiere a eritrocitului depăşeşte posibilitatea de refacere a acestuia (50—100 kR), se ajunge la hemoliză. În figura 4 este schematizată succesiunea proceselor determinate de iradiere, care pot culmina cu hemoliza. Refacerea este cu atît mai posibilă cu cît procesul considerat se află mai spre stînga în schemă.

După cum se remarcă din cele prezentate, natura concretă a leziunii determinate de iradiere la nivelul membranei eritrocitare nu este cunoscută. Variaţiile biochimice, mai uşor de sesizat decît cele structurale, nu reflectă decît un rezultat global, macroscopic al lezării macromoleculelor şi a interacţiunilor moleculare din membrană.

În urma iradierii *in vitro* cu doze mici, de ordinul a 100 R, la care nu se observă variaţii biochimice, sînt posibile schimbări conformaţionale ale macromoleculelor membranare legate de structura lor terţiară şi cuaternară (46), schimbări a căror reversibilitate depinde de temperatură şi nu depinde de metabolism şi care pot răspunde de dereglarea transportului pasiv la aceste doze [7]. Dacă condiţiile refacerii sînt satisfăcute (37°C), nu se ajunge la hemoliză.

La doze la care antioxidanții sînt inactivați (peste 50 kR) începe oxidarea tiolilor membranari și a dublelor legături lipidice. Aceste modificări biochimice corespund unei perturbări ample a structurii membranei. Peroxidarea lipidică duce la variația permeabilității atît prin dispariția unor duble legături lipidice, cît și prin crearea unui potențial oxidant adițional pentru alte grupări chimice importante din membrană. Oxidarea

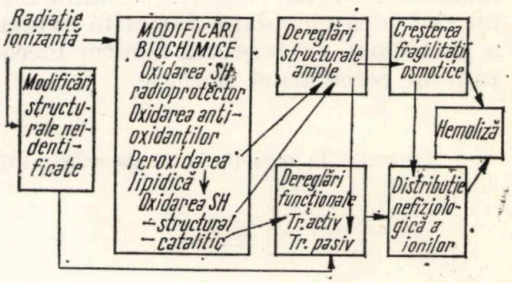


Fig. 4. — Schema etapelor care duc la hemoliză sub acțiunea radiațiilor ionizante.

grupărilor — SH este implicată în perturbarea transportului pasiv datorită faptului că acestea joacă un rol important (dar nelămurit) în structura „porilor" membranari. Lezarea porilor, care în mod normal limitează mișcarea liberă a cationilor, determină „permeabilizarea" membranei. Pe această bază se pot explica toate datele care arată că inhibarea grupărilor —SH duce la modificarea gradienților de concentrație $Na^+ - K^+$. Modificările structurale în urma iradierii duc nu numai la dereglarea transportului pasiv, ci și la creșterea fragilității osmotice. De pildă, capacitatea „tampon de suprafață", asigurată de un echilibru normal $-SH \rightleftharpoons -S-S-$, este diminuată, ceea ce determină o rigiditate mecanică, deci o friabilitate crescută a membranei.

Deși dereglarea transportului pasiv pare să fie principala consecință a acțiunii radiațiilor ionizante asupra transportului prin membrana eritrocitară, există date care arată că și transportul activ poate să fie afectat. Myers și Church [10], studiind influența radiațiilor ionizante asupra enzimelor din stroma eritrocitară, constată variații ale activității ATP-azei, fosfatazei acide etc. Variația de formă a eritrocitelor umane în prezența inhibitorilor transferului fosfatic [47], [48] poate constitui o premisă a hemolizei.

Diminuarea transportului activ constituie un factor adițional la tendința de realizare a echilibrului electrochimic (nefiziologic), pe seama permeabilizării pasive a membranei, în urma lezării structurii acesteia. Perturbarea gradienților normali Na—K duce deci la acumularea de Na în eritrocit. La presiunea coloidosmotică a proteinelor intraeritrocitare se adaugă presiunea osmotică a sodiului, ceea ce determină intrarea apei în eritrocit; după depășirea unui anumit prag, pe fondul fragilității osmotice crescute, are loc hemoliza. Hemoliza indusă de radiațiile ionizante este deci o hemoliză coloid-osmotică. O dovadă indirectă pentru aceasta o constituie posibilitatea de atenuare sau evitare a hemolizei prin suspendarea eritrocitelor în timpul iradierii în medii care conțin agenți osmotic activi (albumina sau sucroza) sau în medii hipertonice [8], [33]. Deși în aceste condiții hemoliza este diminuată, cauza care a generat-o, adică dereglarea echilibrului ionic în urma iradierii, se menține.

Din figura 4 se vede că ultimele etape care duc la hemoliză interacţionează în mod cooperativ, ceea ce face ca, în această fază (la doze foarte mari de iradiere), leziunea indusă de radiaţiile ionizante să fie practic ireversibilă.

Din cele prezentate mai sus rezultă că se cunosc principalele modificări biochimice corelate cu producerea hemolizei de către radiaţiile ionizante. Cu toate acestea, detaliile mecanismelor moleculare ale procesului nu sînt încă elucidate. Datorită evidentei importanţe teoretice şi practice a problemei, cunoaşterea acestor mecanisme constituie un obiectiv important al cercetărilor actuale.

Prezentat la redacţie la 29 noiembrie 1971

Spitalul clinic Fundeni,
Secţia de radiobiologie

BIBLIOGRAFIE

1. J. S. Cook, J. gen. Physiol., **48**, 4 (1965).
2. D. A. Goldstein, A. K. Solomon, J. gen. Physiol., **44**, 1 (1960).
3. F. C. Reman, R. A. Demel, J. de Gier, Chem. Phys. Lipids, **3**, 221 (1969).
4. F. Bresciani, F. Auricchio, C. Fiore, Radiation Res., **21**, 394 (1964).
5. H. Jammet, în *Biochemical Indicators of Radiation Injury in Men*, IAEA, Viena, 1971, p. 223.
6. F. Bresciani, F. Auricchio, C. Fiore, Radiation Res., **22**, 463 (1964).
7. T. Kankura, W. Nakamura, H. Eto, M. Nakao, Int. J. Radiat. Biol., **15**, 125 (1969).
8. G. Kollman, B. Shapiro, Radiation Res,. **33**, 551 (1969).
9. D. K. Myers, R. W. Bide, Radiation Res., **27**, 250 (1966).
10. D. K. Myers, M. L. Church, Nature, **213**, 637 (1967).
11. B. Shapiro, G. Kollman, Radiation Res,. **34**, 335 (1968).
12. R. M. Sutherland, A. Pihl, Biochim. biophys. Acta, **135**, 568 (1967).
13. R. M. Sutherland, A. Pihl, Radiation Res., **34**, 300 (1968).
14. R. M. Sutherland, A. Rothstein, R. J. Weed, J. Cell. Physiol. **69**, 185 (1967).
15. R. M. Sutherland, R. J. Weed, A. Rothstein, J. Stannard, Radiation Res., **27**, 497 (1966).
16. D. K. Myers, T. A. Tribe, R. Mortimer, Radiation Res., **40**, 580 (1969).
17. J. D. Robertson, Ann. N. Y. Acad. Sci., **137**, 421 (1966).
18. M. Glaser, Proc. nat. Acad. Sci., Wash., **65**, 721 (1970).
19. D. R. Phillips, M. Morrison, Biochem. Biophys. Res. Comm. **40**, 284 (1970).
20. A. H. Maddy, Semin. Hematol., **7**, 275 (1970).
21. R. S. Weinstein, N. S. McNutt, Semin. Hematol., **7**, 259 (1970).
22. P. Zahler, Experientia, **25**, 449 (1969).
23. W. Stoeckenius, D. M. Engelman, J. Cell. Biol., **42**, 613 (1969).
24. A. Lehninger, Naturwissenschaften, **53**, 57 (1965).
25. V. Luzzati, F. Reiss Husson, E. Rivas, T. Gulik-Krzywicki, Ann. N. Y. Acad. Sci., **137**, 409 (1966).
26. L. L. Van Deenen, Ann. N. Y. Acad. Sci., **137**, 717 (1966).
27. R. A. Cooper, Semin. Hematol., **7**, 296 (1970).
28. D. Chapman, Ann. N. Y. Acad. Sci., **137**, 745 (1966).
29. B. Shapiro, G. Kollman, D. Martin, J. Cell. Physiol., **75**, 281 (1970).
30. E. Selkov, Biofizika, **15**, 1065 (1970).
31. L. A. Tiunov, G. A. Vasilev, Radiobiologhiia, **8**, 756 (1968).
32. C. Little, P. J. O'brien, Biochem. J., **106**, 419 (1968).
33. H. S. Jacob, H. J. Jandle, J. clin. Invest., **41**, 779 (1962).
34. J. Vansteveninck, J. gen. Physiol., **48**, 617 (1965).
35. M. L. Lakuskin, în *Radiotoxini*, Atomizdat, Moskva, 1966, p. 151—158.

36. I. B. KUDRIAȘOV, în *Radiotoxini*, Atomizdat, Moskva, 1966, p. 147–151.
37. A. M. KUZIN, în *Radiotoxini*, Atomizdat, Moskva, 1966, p. 5–17.
38. J. D. ROBINSON, Nature, **212**, 199 (1966).
39. H. S. JACOB, M. C. BRAIN, J. V. DACIE, J. clin. Invest., **47**, 2664 (1968).
40. H. S. JACOB, Semin. Hematol., **7**, 341 (1970).
41. R. OLINESCU, E. THOMAS, Al. CRISTEA, CL. NICOLAU, Rev. roum. Chim., **12**, 1299 (1967).
42. R. MOSER, J. SCHWARTZMEIER, Folia haemat., **90**, 296 (1968).
43. SONKA J., Cas. Lék. Ces., **107**, 18 (1968).
44. P. GERHARDT, Radiol. Austria, **18**, 239 (1968).
45. Z. VICH, J. KRIKLOVA, Brit. J. Int. Med., **27**, 83 (1970).
46. R. KILKSON, Nobel Symp., **11**, 257 (1969).
47. B. DEUTICKE, Naturwissenschaften, **57**, 172 (1970).
48. P. WINS, Arch. int. Physiol. Biochim., **78**, 225 (1970).

EFFECTS OF IONIZING RADIATIONS ON THE ERYTHROCYTE MEMBRANE

SUMMARY

The ionizing radiations act on the erythrocyte membrane inducing large structural and functional modifications. The concentration of the membrane thiols decreases for an approximate 50 kR dose, due to their oxidation and the formation of disulfide bridges. An evident peroxidation of the membrane lipids takes place for an approximate 70 kR dose, at the same time with the appearance of hemolysis. The damage of the membrane transport starts for the relative low doses of radiations and is due to some structural unidentified modifications of the membrane SH groups. The passive transport seems to be more directly affected by ionizing radiations. The activity of antioxidative compounds is enhanced after the irradiation of the erythrocyte, at the same time with the physiological protection and recovery. An original scheme is suggested for the whole sequence of radiation-induced processes, which lead finally to hemolysis.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 2, 221–229 (1973)

Aspects de la spasticité musculaire (Aspecte ale spasticității musculare), editat de W. BIRKMAYER, Vienne, Masson & Cie, Paris, 1972, 219 p.

Volumul cuprinde 21 de lucrări, semnate de diferiți autori, prezentate într-un simpozion internațional care a avut loc la Viena în luna aprilie 1971.

În aceste lucrări sînt tratate probleme ca: rolul mediatorilor neurochimici ai fusurilor musculare; rolul unor structuri ale sistemului nervos central care intervin în circuitele reglatoare ale tonusului muscular și perturbările care determină apariția simptomatologiei spasmodice. În volum sînt incluse și diferite observații clinice asupra efectelor miorelaxanților, precum și metode de apreciere a eficacității produșilor care reduc spasticitatea, utilizabile și pentru măsurarea hipertoniei musculare de orice tip.

O mare parte din lucrări sînt dedicate unor observații multiple în legătură cu folosirea unui nou medicament antispastic, denumit „LIORESAL" (CIBA–GEIGY), care din punct de vedere chimic este un derivat al acidului gama-aminobutiric și care, împreună cu gruparea para-clorfenil, formează substanța activă a acestui preparat, căruia i se atribuie funcția de mediator cu activitate inhibitoare la nivelul conexiunilor nervoase.

Se prezintă și date în legătură cu sinteza și relația structură-activitate a preparatului, studiul metabolizării lui prin marcare cu C^{14} în poziția beta a lanțului de acid butiric, poziție considerată metabolic stabilă, activitatea lui antispastică și experimentarea preparatului în tratarea sclerozei în plăci și a altor sindroame spastice. Rezultatele studiilor întreprinse deschid noi perspective în terapeutica diferitelor boli spastice provenite, mai ales în ultima vreme, în urma accidentelor. Medicamentul este bine tolerat și nu dă fenomene secundare decît în cazuri foarte rare.

Volumul are o prezentare grafică excepțională și toate lucrările incluse sînt însoțite de o bogată bibliografie.

Cristina Bandu

Institutul de biochimie, București

Na-Linked transport of organic solutes (Transportul Na-dependent al compușilor organici în soluție), editat de E. HEINZ, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg- New York, 1972, 201 p.

Volumul cuprinde lucrările unui simpozion internațional pe tema transportului dependent de sodiu al compușilor organici în soluție, ținut între 3 și 5 august 1971 sub auspiciile Uniunii internaționale de fiziologie și ale Societății de chimie biologică, la Erbach/Rheingau, R. F. Germania.

Deschiderea simpozionului este făcută de E. Heinz, care arată că lucrările care vor fi prezentate reprezintă o confruntare între diferite puncte de vedere privitoare la relațiile dintre electroliți și la transportul compușilor organici în soluție din celule.

Cele 26 de lucrări prezentate la acest simpozion dezbat problema principală: dacă transportul compușilor organici în soluție este cuplat cu o reacție chimică, de exemplu hidroliza ATP, sau cu o mișcare internă a sodiului și externă a potasiului. Cu alte cuvinte, dacă transportul activ al compușilor organici în soluție este primar sau secundar activ. Pentru suportul unora sau altora dintre ipoteze sînt folosite adesea argumente teleologice.

Rezumînd lucrările simpozionului, E. Heinz atrage atenția că un consens final este greu de acceptat la această întîlnire, care însă va contribui cel puțin la limpezirea neînțelegerilor și clarificarea rezultatelor, astfel ca experiențe noi și decisive să ducă la verificarea lor.

Fiecare lucrare prezentată la acest simpozion este bogat ilustrată cu formule, tabele și diagrame. Întreg volumul cuprinde 118 figuri. La sfîrșitul fiecărei lucrări este o listă bibliografică.

Simpozionul acesta este interesant prin faptul că principalele controverse prezentate par să intereseze mai mult interpretările observațiilor decît observațiile însești.

Irina Cornoiu

Institutul de biochimie, București

Plant growth substances (Substanțe de creștere ale plantelor), editat de D.J. CARR, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1972, 837 p.

Volumul de față înmănunchează lucrările celei de-a VII-a Conferințe internaționale asupra substanțelor de creștere ale plantelor, ținută între 7 și 11 decembrie 1970 la Canberra, Australia. Ținînd seama de problemele abordate, cele 103 articole au fost distribuite în 17 capitole, dintre care amintim: biosinteza auxinelor și giberelinelor, legarea hormonilor de constituenții celulari, interdependența dintre hormoni și alte procese fiziologice (înflorire, îmbătrînire), influența lor asupra acizilor nucleici și izoenzimelor, aplicarea unor metode moderne în studierea acestor compuși. Multitudinea cercetărilor întreprinse conturează tot mai precis mecanismul de acțiune al hormonilor. Sînt precizate totodată actualele direcții de cercetare în domeniul substanțelor de creștere. Alte capitole ale cărții se ocupă de studiul inhibitorilor, al citochininelor, al etilenei etc.

Toate lucrările prezentate sînt însoțite de cîte o bibliografie actuală și cuprinzătoare. Această amplă monografie se încheie cu indexuri de autori, de subiecte și de plante pe care s-a lucrat, ușurînd astfel munca celor interesați. Materialul vegetal folosit a fost foarte variat, iar condițiile experimentale dintre cele mai diverse. Remarcăm totodată ținuta grafică ireproșabilă și claritatea celor 461 de figuri, subliniind faptul că volumul oferă date prețioase și utile cercetătorilor din domeniul fiziologiei vegetale.

Ioana Hagima

Institutul de biochimie, București

The biology of imaginal disks (Biologia discurilor imaginare), editat de H. URSPRUNG și R. NÖTHIGER, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1972, 172 p.

Unul dintre domeniile care au adus științelor biologice descoperiri de mare interes teoretic și practic este, fără îndoială, cel al embriologiei. Dezvoltarea diferitelor tipuri de celule la organismele superioare provenind dintr-un singur tip de celulă (zigotul) este desemnată ca *diferențiere celulară*. Diferențierea este inițiată de procesul numit *determinare*, al cărui rol este de a programa celulele pentru viitoarea lor dezvoltare specifică. Renumitul embriolog Ernst Hadorn, ale cărui lucrări realizate pe *Drosofila melanogaster* au dus la descoperiri fundamentale în problema determinării organelor, definea fenomenul de diferențiere celulară ca acel „proces care inițiază o anumită cale specifică de dezvoltare dintr-o multitudine de căi posibile pentru care un sistem celular este competent". Studiul discurilor imaginare la insecte reprezintă un sistem experimental ideal pentru înțelegerea complexului fenomen de determinare. Ce sînt discurile imaginare? Aceste discuri sînt alcătuite din grupuri de celule aparent fără o funcție deosebită și care cresc în larvă sub formă de mase discrete de celule reprezentînd primordiile structurilor adultului. La un anumit semnal, de natură hormonală, se declanșează diferențierea celulară ca urmare a unui program conținut în discurile imaginare și care le condiționează dezvoltarea viitoare.

Prezentul volum, care face parte dintr-o serie consacrată problemelor de diferențiere celulară — la a cărui realizare și-au adus contribuția autori de prestigiu —, își propune să înfățișeze ultimele descoperiri în domeniul biologiei discurilor imaginare.

Într-o primă secțiune se discută aspecte legate de formarea celor două tipuri de celule larvare și epiderma imaginară; creșterea și morfogeneza discurilor; trecerea de la multiplicare la diferențiere și dobîndirea și propagarea stării de determinare. În alte trei secțiuni sînt trecute în revistă probleme interesînd culturile de discuri la *Drosofila*, formarea viitoarelor structuri din discurile imaginare și cercetări histologice care ilustrează morfologia complexă a discurilor.

În ultimele două secțiuni sînt prezentate cercetări privind sinteza diferitelor tipuri de acizi nucleici sau de proteine în strînsă legătură cu rolul hormonilor în aceste procese, respectiv date experimentale despre controlul hormonal al dezvoltării discurilor imaginare.

Bogata listă bibliografică înlesnește aprofundarea problemelor expuse în acest volum care constituie un îndreptar deosebit de util cercetătorilor din domeniul embriologiei moderne.

Ștefan Hulea

Institutul de biochimie, București

Catecholamines. Handbuch der experimentellen Pharmakologie (Catecolamine. Tratat de farmacologie experimentală), vol. XXXIII, editat de H. BLASCHKO și E. MUSCHOLL, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1972, 1055 p., 167 fig.

Volumul XXXIII din seria „Handbuch der experimentellen Pharmakologie" prezintă o sistematizare a tuturor datelor teoretice și experimentale privind catecolaminele, substanțe

importante în transmisia umorală a efectelor stimulării nervoase, atît în sistemul nervos central, cît şi în cel autonomic. Lucrarea, deosebit de amplă (are 20 de capitole), reuneşte printre autori pe cei mai buni specialişti în acest domeniu.

Sînt analizate diferite aspecte ale biosintezei şi depozitării catecolaminelor, localizarea lor în ţesuturi, la nevertebrate şi vertebrate, precum şi mecanismul eliberării lor ca hormoni şi mediatori chimici şi metabolizarea lor.

Cîteva capitole prezintă rolul catecolaminelor în reglarea proceselor metabolice în condiţii fiziologice şi semnificaţia lor în unele condiţii patologice.

Sînt de asemenea prezentate cîteva din influenţele pe care unele medicamente le exercită asupra sintezei, absorbţiei şi depozitării catecolaminelor în organism şi interferenţa lor în metabolizarea acestora.

Materialul documentar este reprezentat de tabele, grafice, formule şi fotografii la microscopul electronic, redate în condiţii grafice deosebite. Bibliografia, deosebit de bogată, este dată la sfîrşitul fiecărui capitol. Volumul mai cuprinde un index de autori şi un index de subiecte.

Olguţa Macovschi

Catedra de biochimie şi chimie sanitară,
Facultatea de farmacie, IMF,
Bucureşti

EDWIN A. DAVES, *Quantitative problems in biochemistry* (Probleme cantitative în biochimie), Churchill Livingstone, Edinburgh—London, 1972, 470 p.

Progresele realizate în ultimii douăzeci de ani de biochimia fizică şi biofizică au determinat un salt important de la etapa calitativă la alta mai matură care permite abordarea cantitativă a viului. Această situaţie reclamă biochimistului cunoştinţe atît de fiziologie şi chimie organică, cît şi de chimie fizică. De aceea apariţia oricărui manual care atacă pe cale fizico-chimică problemele specifice biochimiei este binevenită.

Un astfel de manual este cel de faţă, aflat la a cincea ediţie. Autorul ei, profesor de biochimie la Leeds şi Glasgow, a introdus în fiecare capitol noţiuni teoretice relative la subiectul abordat, cîteva probleme rezolvate, precum şi o listă de probleme propuse cititorului spre rezolvare. Deşi cartea este un manual de lucru şi nu are ambiţii de teoretizare, fiecare capitol are o bibliografie pentru cei interesaţi în aprofundarea respectivelor aspecte teoretice.

Manualul cuprinde probleme de determinare a greutăţii moleculare, probleme referitoare la caracterul de electrolit al proteinelor, probleme de energetică şi termodinamică biochimică, de echilibre, cinetică de reacţie şi cinetică enzimatică, analiză optică şi fotometrică, potenţiale de oxidoreducere, probleme derivate din creşterea bacteriilor şi folosirea izotopilor în biochimie.

Un apendice cuprinde date necesare rezolvării problemelor propuse şi răspunsurile la acestea. Manualul se încheie cu un indice de autori şi altul de subiecte. El se recomandă studenţilor şi cercetătorilor în biochimie, precum şi celor ce lucrează în domenii înrudite.

Constanţa Muşolan

Institutul de biochimie, Bucureşti

J. T. BARRETT, *Textbook of immunology. An introduction to immunochemistry and immunobiology* (Manual de imunologie. Introducere în imunochimie și imunobiologie), C.V. Mosby Company, Saint Louis, 1970, 324 p., 185 fig.

Lucrarea se adresează în special studenților. În consecință, cartea a fost concepută ca un manual de imunologie, cuprinzînd atît capitole de chimie a imunoglobulinelor, cît și de filogenie a răspunsului imun și de aspecte celulare ale răspunsului imun. Lucrarea cuprinde trei părți.

Prima parte, „Bazele imunologiei", are patru capitole referitoare la istoria imunologiei, la antigene și haptene ca inițiatoare ale răspunsului imun, la aspecte biologice ale formării imunoglobulinelor și la proprietățile imunochimice ale imunoglobulinelor.

Partea a doua este dedicată reacțiilor serologice, și anume reacției de precipitare și de aglutinare, participării complementului în reacțiile imune și fagocitozei, punîndu-se accentul, mai ales, pe principiile tehnicilor imunochimice care se bazează pe aceste reacții.

Partea a treia tratează aspectele *in vivo* ale imunologiei, materialul fiind grupat în patru capitole : imunitatea naturală și dobîndită, hipersensibilitatea de tip imediat, hipersensibilitatea de tip întîrziat și autoalergia naturală și experimentală.

Stilul clar și concis al cărții oferă posibilitatea unei informări rapide asupra problemelor de bază ale imunologiei. Indicațiile bibliografice ce însoțesc fiecare capitol reprezintă o bibliografie selectată, cu articole generale și cărți de specialitate.

Lucrarea mai cuprinde o trecere succintă în revistă a problemelor mai importante de chimie a macromoleculelor, pentru a ajuta cititorul în înțelegerea problemelor de imunochimie. Tot în acest scop, la sfîrșitul cărții, autorul propune consultarea a opt articole științifice, alese dintre lucrări cu importanță istorică, asupra unor descoperiri importante în imunologie. În acest fel, o serie de probleme tratate în carte își capătă suportul bibliografic, familiarizînd, totodată, pe student cu terminologia literaturii de specialitate.

Doina Onică

Institutul de biochimie, București

A. A. BÜHLMANN, E. R. FROESCH, *Pathophysiologie* (Fiziologie patologică), Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1972, 320 p., 41 fig.,

Volumul de față, tipărit în ediție de buzunar, prezintă o tratare sistematică a bazelor biochimice și fiziologice ale diferitelor boli ale organismului și a modificărilor corespunzătoare ce apar în cazuri patologice. Cartea se adresează în primul rînd studenților în medicină, care au ca disciplină de studiu fiziologia patologică ; ea este însă utilă oricărui medic interesat în aprofundarea bazelor fiziopatologice ale bolilor organismului uman.

Dintre cele zece capitole ale cărții, menționăm : Respirația (A. A. Bühlmann), Inima și circulația sangvină (A. A. Bühlmann, P. Lichtlen), Rinichiul (W. A. Scheitlin), Conținutul de apă și de electroliți (A. A. Bühlmann), Echilibrul acido-bazic (A. A. Bühlmann), Metabolismul oaselor, al ionilor de calciu și de fosfat (E. R. Froesch). Mai larg dezvoltate sînt capitolele

referitoare la sînge (P. G. Frick, P. W. Straub) și la organele digestive (M. Schmid, M. Knoblauch). Menționăm că fiecare din capitolele cărții cuprinde două părți : o parte privind biochimia și fiziologia stării normale a organului sau țesutului cercetat și o parte ce tratează modificările care însoțesc stările patologice ale acestuia.

Volumul prezintă — pe lîngă cercetările clasice, de bază, din domeniul fiziologiei patologice — o serie de probleme actuale și cercetări recente. Dealtfel, bibliografia care însoțește această carte cuprinde numeroase lucrări apărute între anii 1969—1971. Cartea se încheie cu un util indice de subiecte și cu o listă de cărți — din domeniile medicină și biologie — apărute în aceeași ediție de buzunar (Heidelberger Taschenbücher).

Ilustrația grafică a cărții — tabele, figuri, grafice — ajută la reținerea sistematică a materialului prezentat.

Doina Popov

Institutul de biochimie, București

R. KANDELER, *Entwicklungsphysiologie der Pflanzen* (Fiziologia dezvoltării plantelor), Colecția Göschen de Gruyter, vol. 7001, ed. Walter de Gruyter, Berlin—New York, 1972, 160 p.

Această carte prezintă, într-un mod concis și sistematic, cîteva din problemele actuale ale fiziologiei dezvoltării plantelor. Făcînd apel la date recente din științe conexe — botanică, chimie și biochimie —, autorul explică unele din procesele fiziologice de bază ale dezvoltării plantelor.

Problematica abordată este grupată în cinci capitole : 1 : Procesele de bază ce dirijează dezvoltarea plantelor (modificări ale proprietăților membranelor, influența hormonilor vegetali, efectul factorilor de mediu etc.) ; 2 : Dezvoltarea componenților subcelulari ; 3 : Dezvoltarea celulei vegetale ; 4 : Dezvoltarea țesuturilor ; 5 : Dezvoltarea cormului (morfogeneza organelor vegetative ale plantelor, formarea frunzelor, dezvoltarea fructelor etc.). Pentru biochimiștii vegetali este interesant mai ales cel de-al doilea capitol al acestei cărți ; se găsesc aici aspecte ale procesului de dezvoltare a mitocondriilor vegetale, de dezvoltare a plastidelor, de creștere a nucleului celular, precum și date asupra proceselor de dezvoltare a membranelor vegetale.

Alături de prezentarea logică a materialului, ilustrațiile și aspectul grafic al volumului facilizează accesibilitatea acestuia pentru studenții în biologie, biologi și biochimiști. Caracterul didactic al acestei cărți este completat printr-o listă de cărți și manuale din domeniul fiziologiei dezvoltării plantelor, precum și prin bibliografia corespunzătoare fiecăruia din capitolele volumului. Cartea se încheie cu un index de subiecte.

Doina Popov

Institutul de biochimie, București

Handbook of sensory physiology. Vol. VII/1. Photochemistry of vision (Tratat de fiziologie senzorială. Vol. VII/1. Fotochimia vederii), ed. H.J.A. DARTNALL, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1972, 810 p., 296 fig.

Problema care face obiectul acestui volum este tratată de un mare număr de specialişti, aparţinînd unor discipline diferite; materialul este împărţit în 18 capitole.

Capitolul introductiv se ocupă de principiile interacţiunii luminii cu materia şi este urmat de numeroase capitole care au ca subiect principal chimia şi fotochimia pigmenţilor vizuali. Studiul fotochimic al acestora este completat cu studiul lor fotobiologic; volumul conţine o descriere amănunţită a pigmenţilor vizuali şi a celulelor corespunzătoare din tot regnul animal, de la nevertebrate la vertebratele superioare şi om, iar tratarea problemei se face atît din punct de vedere taxonomic, cît şi ecologic. Sînt prezentate date despre chimia, structura, spectrele şi reactivitatea pigmenţilor vizuali, fotosensibilitate, sistemul vizual rodopsină-porfiropsină, microspectrofotometria fotoreceptorilor. Datele mai vechi, obţinute în studiul pigmenţilor vizuali preparaţi prin metode extractive (care nu dăduseră rezultate prea bune în cazul conurilor), sînt completate de date recente, obţinute cu metodele de densitometrie retinală şi microspectrofotometrie.

Deşi volumul conţine o multitudine de date importante, rămîn încă o serie de aspecte care nu au fost studiate sau explicate; acest lucru i-a făcut pe autori ca, în cadrul indexului de subiecte, să rezerve o rubrică „problemelor nerezolvate".

Bazată pe o foarte bogată şi modernă bibliografie, cartea se adresează cercetătorilor care se ocupă de studiul vederii, avînd totodată scopul de a atrage specialişti şi din alte domenii; conţine un index de subiecte şi unul de autori.

Gabriela Romalo

Institutul oncologic, Bucureşti

E. W. HORTON, *Prostaglandins* (Prostaglandinele), Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1972, 197 p., 97 fig.

Volumul face parte din seria „Monografii în endocrinologie"; nu constituie un tratat despre prostaglandine, ci autorul s-a ocupat în mod special de unele aspecte care i s-au părut mai interesante şi în care a avut o contribuţie personală. Materialul este împărţit în 15 capitole, la sfîrşitul cărora se află bibliografia.

În introducere se prezintă cîteva generalităţi despre descoperirea prostaglandinelor, proprietăţi farmacologice, izolare şi structură, substanţe analoage şi nomenclatură.

Capitolele 2 şi 3 se ocupă de chimia prostaglandinelor; se descriu metodele de extragere, separare, identificare şi determinare, distribuţia în organism, sinteză. Datele biochimice se referă la biosinteza şi metabolismul acestor compuşi. Capitolele 6—14 conţin date referitoare la acţiunea farmacologică a prostaglandinelor; se analizează efectul lor asupra muşchiului neted al tractului feminin de reproducere, sistemului endocrin, ţesutului adipos, sistemelor nervos (central şi periferic), cardiovascular şi urinar, plachetelor sanguine, tractului gastro-

intestinal și respirator. Volumul se încheie cu un capitol în care se discută semnificația biologică a prostaglandinelor.

Monografia se adresează unui mare număr de specialiști ce lucrează în domeniul experimental. Conține o bogată bibliografie (500 de referințe) și un index de subiecte.

Gabriela Romalo

Institutul oncologic, București

M. G. STRINGARIS, *Die Haschischsucht. Pharmakologie, Geschichte, Psychopathologie, Klinik, Soziologie* (Mania haşişului. Farmacologie, istoric, psihopatologie, clinică, sociologie), Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1972, ediția a II-a revizuită, 150 p.

Prezenta carte este o monografie extrem de interesantă, scrisă de un specialist care se ocupă de mai bine de patru decenii de multiplele aspecte și repercusiuni fiziologice, psihice și sociale legate de consumul haşişului, problemă de mare actualitate în multe regiuni ale globului.

În primul capitol autorul prezintă o serie de amănunte despre botanica, cultivarea și răspîndirea plantei din care se extrage drogul, despre metodele de extracție și preparatele, uneori foarte curioase, ale drogului, precum și despre farmacologia și chimia agenților activi ai drogului. Aflăm, între altele, încă peste 300 de termeni diferiți ai acestui drog cunoscut deobicei sub numele de haşiş sau marihuana.

În al doilea capitol, autorul dă istoricul și aria de răspîndire a consumului de haşiş, din cele mai vechi timpuri și pînă în prezent.

Obiceiurile și ritualurile respectate la consumarea de haşiş fac obiectul capitolului al III-lea. Sînt prezentate, pe rînd, modalitățile și formele sub care drogul este consumat, fumatul în grupuri, cantitățile consumate etc.

Capitolul al IV-lea este consacrat formelor de intoxicație ce apar în urma acțiunii directe a haşişului. Se prezintă la început diferite încercări de a sistematiza formele perturbațiilor psihice din punct de vedere clinic, apoi se trece la prezentarea formelor acute, dintre care amintim beția haşişului în general sau cea provocată pe voluntar în scopuri științifice, aspectele specifice legate de primul contact cu drogul, beția în urma consumării repetate a drogului etc. Capitolul se încheie cu intoxicația cronică de haşiş și cu caracterizarea psihică și fizică a consumatorului de haşiş.

Capitolul al V-lea este consacrat psihozelor provocate de haşiş. Autorul arată locul specific pe care aceste psihoze îl ocupă în psihiatrie, prezintă o serie de stări caracteristice ale acestora și problemele care apar la suprapunerea intoxicațiilor cu haşiş cu psihoze endogene.

Ultimul capitol, al VI-lea, este consacrat analizei urmărilor sociale ale consumului de haşiş. Autorul caută un răspuns pentru motivele care stau la baza consumării de haşiş, arată repercusiunile multilaterale ale consumului acestui drog, analizează legătura între haşiş și criminalitate, dă cifre și date statistice privind contrabanda internațională și încheie cu aspectele și problematica combaterii acestui drog.

Materialul expus în prezenta carte este îmbogăţit prin numeroase protocoale experimentale culese atît în clinici, cît şi de la persoane care s-au oferit voluntar pentru studiul efectelor drogului.

O literatură deosebit de bogată (peste 500 de trimiteri bibliografice), cuprinzînd lucrări de specialitate din cele mai vechi timpuri şi pînă în zilele noastre, şi un index alfabetic pe subiecte întregesc în mod fericit această valoroasă monografie.

Horst D. Schell

Institutul de biochimie, Bucureşti

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca: Viaţa ştiinţifică, în care prin note scurte sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei: congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc., Recenzii, în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie: str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 63, sectorul 1.

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA
ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

M. ŞERBAN şi D. COTARIU, **Biochimia contracţiei musculare**, 1970, 240 p., 20,50 lei.

I. DICULESCU, DOINA ONICESCU şi LETIŢIA MISCHIU, **Biologie celulară**, 1971, 420 p., 36 lei.

N. SĂLĂGEANU, **Fotosinteza**, 1972, 243 p., 5 pl., 13 lei.

V. D. MÂRZA şi H. ARAŢEI, **Biomorfologia corticalei ovariene la mamifere**, 1972, 180 p., 2 pl., 8 lei.

P. RAICU, M. IONESCU-VARO, G. GANCEVICI şi GABRIELA MOISESCU, **Celula. Structură, ultrastructură şi funcţii**, 1972, 344 p., 12 pl., 26 lei.

EUGEN MACOVSCHI, **Natura şi structura materiei vii**, 1972, 184 p., 4 pl., 15 lei.

La revue „Studii şi cercetări de biochimie" paraît 4 fois par an. Le prix d'un abonnement annuel est de $ 5—. Toute commande à l'étranger sera adressée à Întreprinderea Rompresfilatelia, Boîte postale 2001 telex 011631, Bucarest, Roumanie, ou à ses représentants à l'étranger. En Roumanie, vous pourrez vous abonner par les bureaux de poste ou chez votre facteur.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 16, NR. 2, P. 115—230, BUCUREŞTI, IUNIE 1973

I.P. „Informaţia" — c. 2710

43816

Lei 20.—

F 1330

studii şi cercetări de biochimie

3

TOMUL 16

1973

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 16, nr. 3, p. 231–344, Bucureşti, septembrie 1973

SCBIAS — 16 (3), 231–344 (1973)

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

Academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacție:

VICTOR GHEȚIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 80 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții. Revista se poate procura (direct sau prin poștă) și prin PUNCTUL DE DESFACERE din cadrul Editurii Academiei.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se fac prin Întreprinderea Rompresfilatelia, Căsuța poștală 2001 — telex 011631, București, România, sau prin reprezentanții săi din străinătate.

Manuscrisele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență, se vor trimite pe adresa comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie": București, str. Docentilor, nr. 20, sectorul 1.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
București, str. Gutenberg nr. 3 bis, sectorul 6

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

Tomul 16, nr. 3 1973

SUMAR

V. ALEXANDRESCU, T. MUREŞAN, D. POPOV, F. MIHĂILESCU, I. HAGIMA şi O. COSMIN, Formele moleculare ale unor enzime din seminţele unor linii de porumb *(Zea mays)* 235

C. BĂCLEŞEANU, Z. COJOCARU şi C. NISTOR, Controlul metabolic în terapia hipoglicemiantă cu derivaţi pirazolici 243

G. BENGA, Caracterizarea imunochimică a mitocondriilor din ficatul uman . . . 251

V. BOTA, I. V. KOVÁCS şi S. ÁDÁM, Acţiunea codeinei asupra activităţii unor enzime din ficatul şi serul de şobolan 261

I. BRAD, Un nou sistem de reprezentare a datelor referitoare la metabolismul intermediar 269

L. M. BURUIANĂ, Izoenzimele şi cinetica glutamat-oxalacetat aminotransferazei (E.C.2.6.1.1.) din sperma de taur 279

O. CHITA, D. TĂNĂSESCU, V. STOENESCU şi V. DARIE, Modificări biochimice survenite la tuberculele de cartofi din soiurile Carpatin, Colina şi Galben timpuriu iradiate cu raze gama 287

V. JURCĂ, Influenţa ionilor de litiu asupra fosforilării oxidative şi a activităţii succinatdehidrogenazei din mitocondrii 295

C. GH. MACAROVICI, B. BÖHM şi L. BOZAC, Determinarea fosforului în substanţele separate prin cromatografie pe silicagel 301

D. PARASCHIVESCU şi I. HURGHIŞIU, Influenţa mediului din unele biotopuri ale zonei subcarpatice asupra conţinutului în aminoacizi liberi la cîteva specii de nevertebrate 305

V. TĂMAŞ, E. ANGI şi E. ŞUTEU, Carotinemia la animale parazitate. I. Carotinemia la ovine parazitate cu nematozi gastrointestinali din familia *Trichostrongylidae* 309

NOTĂ DE LABORATOR

L. SCOLNIC, Adaptarea tehnicii de fixare cu hidroxid de sodiu la determinarea fosfocreatinei din muşchiul gastrocnemian de broască în contracţie . . . 313

REFERAT GENERAL

M. IONESCU, Asupra biochimismului formării şi degradării acizilor humici . . 317

RECENZII 337

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

Tome 16, no. 3 1973

CONTENTS

V. ALEXANDRESCU, T. MUREŞAN, D. POPOV, F. MIHĂILESCU, I. HAGIMA, O. COSMIN, The molecular forms of some enzymes in the seeds of some maize *(Zea mays)* inbred lines 235

C. BĂCLEŞEANU, Z. COJOCARU, C. NISTOR, Metabolic control in the hypoglycemiante therapy with pyrazole derivatives 243

G. BENGA, Immunochemical characterization of human liver mitochondria . . . 251

V. BOTA, I. V. KOVÁCS, S. ÁDÁM, The codeine action upon some hepatic and serum enzymes in rat 261

I. BRAD, A new system of presentation the data concerning the intermediary metabolism 269

L. M. BURUIANĂ, The isoenzymes and the kinetics of glutamate oxalacetate aminotransferase (E.C.2.6.1.1.) of bull seminal plasma 279

O. CHITA, D. TĂNĂSESCU, V. STOENESCU, V. DARIE, Biochemical modifications of potato tubers of Carpatin, Colina and Galben timpuriu varieties, gamma-rays irradiated 287

V. JURCĂ, The influence of lithium on the oxidative phosphorylation and on succinicdehydrogenase activity in mitochondria 295

C. GH. MACAROVICI, B. BÖHM, L. BOZAC, Phosphorus determination in the substances separated by silicagel thin-layer chromatography 301

D. PARASCHIVESCU, I. HURGHIŞIU, The medium influence of some biotope from the subcarpathian zone on the content in free amino acids in a few invertebrate species 305

V. TĂMAŞ, E. ANGI, E. ŞUTEU, Carotenemia of parasitized animals. I. Carotenemia of sheep parasitized by gastrointestinal nematodes belonging to the *Trichostrongylidae* family 309

LABORATORY NOTE

L. SCOLNIC, Adaptation of the fixation technique with sodium hydroxide to the study of creatine phosphate in frog gastrocnemius muscles during contraction 313

REVIEW

M. IONESCU, The biochemistry of humic acids formation and breakdown . . . 317

BOOK REVIEW 337

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 3, 235–241 (1973)

FORMELE MOLECULARE ALE UNOR ENZIME DIN SEMINȚELE UNOR LINII DE PORUMB (*ZEA MAYS*)

VICTORIA ALEXANDRESCU, T. MUREȘAN, DOINA POPOV, F. MIHĂILESCU, IOANA HAGIMA și O. COSMIN

Rezumat. — S-au cercetat formele moleculare, separabile electroforetic, ale peroxidazei, catalazei, enzimelor amilolitice și fosfatazei acide din semințele (embrionul și endospermul) a șapte linii consangvinizate de porumb. Am constatat că unele linii consangvinizate de porumb pot evidenția enzimograme specifice. Gradul lor de variabilitate descrește în ordinea: peroxidază, catalază, fosfatază acidă și enzime amilolitice.

Luînd în considerare rezultatele publicate anterior se poate constata că enzimogramele liniilor consangvinizate sînt mai diferite între ele decît acelea ale diferiților hibrizi și soiuri. Prin urmare, încrucișările multiple duc spre uniformizarea spectrelor izoenzimatice, iar autopolenizările determină segregări succesive care evidențiază spectre izoenzimatice diferite, probabil cele ale soiurilor ancestrale.

Studiul izoenzimelor este astăzi în atenția enzimologilor atît sub aspectul structurii lor, cît și mai ales sub acela al rolului diferit pe care ele l-ar putea avea în cadrul metabolismului. Jaaska a arătat că enzimogramele fosfatazei acide au o anumită valoare taxonomică în stabilirea relațiilor filogenetice dintre taxele genurilor *Triticum* [1], [2] și *Secale* [3]. Prin analizarea enzimogramelor peroxidazei, Chu [4], lucrînd pe orez, iar T. Mureșan și colab. [5], lucrînd pe porumb, au stabilit diferențe și asemănări interesante între semințele unor linii, hibrizi, varietăți și populații. Cercetările publicate de Shahi și colab. [6], efectuate pe specii de *Oryza*, și ale lui Marshall și Allard [7], asupra unor specii de *Avena*, au evidențiat existența unei variabilități a enzimogramelor pentru fosfataza acidă, peroxidază etc., atît între specii, cît și în cadrul aceleiași specii. Deși există specii cu enzimograme caracteristice, identificarea lor pe această cale pare dificilă, deoarece ariile de distribuție ale diferitelor izoenzime se suprapun, sugerînd că genele specifice lor pot fi distribuite comun între specii diferite.

În lucrarea de față am cercetat formele moleculare, separabile electroforetic, ale peroxidazei, catalazei, enzimelor amilolitice și fosfatazei acide prezente în semințele (embrionul și endospermul) a șapte linii con-

sangvinizate de porumb. Scopul lucrării este acela de a stabili variaţia formelor moleculare ale enzimelor de mai sus, în cadrul liniilor consangvinizate de porumb analizate.

MATERIAL ŞI METODE

Cele şapte linii de porumb consangvinizate ale căror seminţe s-au examinat în prezenta lucrare au fost create la I.C.C.P.T.-Fundulea. Probele respective sînt notate cu numerele de la 1 la 7.

S-a lucrat pe embrioni (ax embrionar plus scutel) şi endospermi, separaţi manual după o prealabilă îmbibare cu apă, timp de 3—4 ore. După uscare la temperatura camerei, embrionii au fost mojaraţi, iar endospermii măcinaţi. Extracţia proteinelor s-a făcut timp de o oră în soluţie de NaCl 9‰, raportul de extracţie fiind 5 ml/1 g, în cazul embrionilor şi, 2 ml/1 g, în cazul endospermilor; după dializă extractul s-a iofilizat.

Peroxidaza. Electroforeza s-a efectuat în gel de agar (Special Agar Noble-Difco Laboratories) 1,5%, în tampon de acid boric 0,2 M-borax 0,05 M, pH = 8,4, pe plăci de 15 × 3 cm, timpul de migrare fiind de 5 ore; pentru plăci s-a utilizat acelaşi tampon, diluat cu două părţi de apă distilată. S-a lucrat la 180 V, cu 0,5 mA/cm. Evidenţierea activităţii peroxidazei pe plăci s-a făcut prin imersarea acestora timp de 5 min în soluţie tampon de acid acetic-acetat de sodiu 0,2 M, pH = 4,7, saturată cu guaiacol, şi apoi în apă oxigenată 0,1‰.

Catalaza. Electroforeza s-a efectuat în gel de agar 1,5%, însă, spre deosebire de peroxidază, s-a lucrat cu Special Agar Noble NBC, deoarece acesta formează un gel mai dens, în care bulele de oxigen se formează mici şi regulate. S-a lucrat la 210 V, 0, 7 mA/cm, celelalte condiţii experimentale fiind identice cu cele de la peroxidază. Evidenţierea activităţii catalazice s-a făcut după metoda lui Uriel [8], prin imersarea plăcilor timp de cîteva minute în apă oxigenată 2‰.

Enzime amilolitice. Electroforeza s-a efectuat în gel de agar 1,25% (Special Agar Noble-Difco Laboratories), cu adaos de 0,5% amidon pentru electroforeză (Mann), pe plăci de 15 × 3 cm, folosindu-se în cuvă tamponul acid succinic 0,013 M-hidroxid de sodiu 0,0224 M, cu adaos de fosfat disodic 0,0167 M, vol/vol, pH = 8,4; pentru plăci s-a utilizat acelaşi tampon, diluat cu două părţi de apă distilată. S-a lucrat la 190 V, 0,5 mA/cm, timpul de migrare fiind de 5 ore. Plăcile s-au incubat la 37—40°C, timp de 30—60 min, după caz, apoi s-au imersat cîteva secunde într-o soluţie de iod în iodură de potasiu [9].

Fosfataza acidă. Electroforeza s-a făcut în gel de poliacrilamidă 5%, în sistem vertical, în soluţie tampon TRIS-EDTA.Na_2-H_3BO_3, pH = 8,4, pe plăci de 13 × 8 cm, timp de 3 ore, la 290 V şi 17—25 mA/13 cm. Evidenţierea activităţii fosfatazice s-a făcut după metoda Hruska [10], prin imersarea gelurilor, timp de 4 ore la temperatura de 37°C, în tampon de acid acetic-acetat de sodiu 0,2 M, pH = 4,0, conţinînd β-glicerofosfat de sodiu 0,5%, azotat de magneziu 0,5%, azotat de calciu 0,5%, acid ascorbic 0,2% şi molibdat de amoniu 0,15%.

REZULTATE

Fracţiunile electroforetice evidenţiate pentru cele patru enzime urmărite sînt toate electronegative avînd în vedere fenomenul de electroendosmoză din gelul de agar. Punctul zero electric a fost determinat cu amidon solubil [11].

Peroxidaza. Enzimogramele peroxidazei din embrionii liniilor consangvinizate de porumb cercetate (fig. 1 a) evidenţiază o variabilitate mare atît ca număr de fracţiuni, cît şi ca intensitate a activităţii manifestate. Astfel, de la start spre anod s-au evidenţiat între una şi trei fracţiuni, iar spre catod între două şi cinci fracţiuni. Nu s-au observat cazuri de identitate a enzimogramelor peroxidazei extrase din embrionii diferitelor linii consangvinizate de porumb cercetate, la fiecare din aceste linii obţinîndu-se enzimograme bine individualizate. Ca o caracteristică se constată că embrionii conţin, ca forme moleculare bine reprezentate, fracţiuni peroxidazice puternic electronegative şi altele foarte slab electronegative; formele intermediare din punct de vedere al sarcinii electrice globale sînt slab reprezentate. Excepţie observăm doar la linia nr. 4, care are foarte slab reprezentate fracţiunile puternic electronegative, dar în care se dovedeşte foarte activă fracţiunea cu mobilitate electroforetică intermediară. Cercetări imunochimice efectuate anterior [12] ne-au arătat că în intervalul de la start pînă la fracţiunile slab electronegative dinspre catod există molecule de peroxidază, dar activitatea lor este slabă, fiind sub limita de vizualizare cu guaiacol.

Enzimogramele peroxidazei din endospermi (fig. 1 b) evidenţiază de asemenea imagini specifice fiecărei linii consangvinizate de porumb. De la start spre anod se observă una pînă la trei fracţiuni, iar spre catod patru fracţiuni. Aspectul diferit al enzimogramelor este determinat de intensitatea activităţii acestor forme moleculare şi de diferenţele în mobilitatea lor electroforetică.

Catalaza. O mare dificultate în aprecierea numărului de fracţiuni cu activitate catalazică decurge din faptul că acestea nu se separă net între ele, catalaza ocupînd un spaţiu mai lat sau mai puţin lat, în funcţie de cantitatea de enzimă aplicată pe placă. Noi am considerat ca optimă cantitatea de enzimă care produce benzi de lăţimea startului. În aceste condiţii am apreciat că există una sau mai multe fracţiuni catalazice după întinderea bulelor de oxigen în gel şi în funcţie de arcuirea marginilor benzilor.

În enzimogramele catalazei din embrionii liniilor consangvinizate de porumb (fig. 2 a) se disting, după mobilitatea electroforetică, în total patru fracţiuni, din care una plasată între start şi anod şi trei între start şi catod, însă nici una din enzimograme nu cuprinde toate aceste patru fracţiuni, ci numai pe unele din ele. Embrionii liniilor nr. 1 şi nr. 5 conţin fracţiunile catalazice unu, doi şi trei, linia nr. 6, fracţiunile unu şi trei, linia nr. 7 fracţiunile trei şi patru, liniile nr. 2 şi nr. 3 fracţiunea doi, iar linia nr. 4 fracţiunea trei. Pe de altă parte, se mai constată că linii consangvinizate diferite pot da enzimograme catalazice asemănătoare cum sînt liniile consangvinizate nr. 1 şi nr. 5, nr. 2 şi nr. 3 (cu excepţia că linia nr. 3 posedă o activitate catalazică slabă).

Catalaza din endospermi (fig. 2 b) s-a putut evidenţia sub trei forme moleculare din punct de vedere al mobilităţii electroforetice (lipseşte fracţiunea cea mai slab electronegativă, fracţiunea a patra, din schema dată pentru embrioni). Astfel, endospermii liniilor nr. 1 şi nr. 5 evidenţiază toate trei fracţiunile, linia nr. 3 fracţiunile doi şi trei, iar celelalte linii cîte o singură fracţiune : linia nr. 2 şi nr. 7 fracţiunea a doua, linia nr. 4 şi nr. 6 fracţiunea a treia. Moleculele catalazei din endospermii liniilor consangvinizate analizate arată, comparativ cu peroxidaza, o diversificare mai mică după mobilitatea electroforetică ; se găsesc trei perechi de linii asemănătoare : nr. 1 cu nr. 5, nr. 2 cu nr. 7 şi nr. 4 cu nr. 6.

Enzime amilolitice. Separarea electroforetică a enzimelor amilolitice din embrionii liniilor consangvinizate de porumb cercetate este redată în figura 3 a. Se constată, în general, prezenţa a opt fracţiuni, excepţie făcînd însă linia nr. 3, la care se observă doar şapte. Aşadar, enzimogramele enzimelor amilolitice prezintă un aspect mai puţin variat decît cele ale peroxidazei şi catalazei. De la start spre anod se observă trei fracţiuni cu activitate enzimatică scăzută, mai intens sau mai slab conturate, în funcţie de linia analizată. De la start spre catod se observă cinci fracţiuni electroforetice ale enzimelor amilolitice la toate liniile consangvinizate ; excepţie face linia nr. 3 la care se evidenţiază doar patru fracţiuni. Două fracţiuni posedă o activitate mare. La toate liniile de porumb cercetate, cu excepţia liniei nr. 3, între aceste două fracţiuni cu activitate puternică se evidenţiază o fracţiune amilolitică mai slabă. Mai spre catod se formează o zonă brun-roşcată în cadrul căreia, după o hidroliză mai prelungită, se concretizează două fracţiuni amilolitice.

Enzimogramele enzimelor amilolitice din endospermii liniilor consangvinizate de porumb analizate (fig. 3 b) evidenţiază diferenţe mai nete comparativ cu cele din embrioni. Diferenţele constau atît în intensitatea activităţii amilolitice, cît şi în numărul fracţiunilor evidenţiate. Endospermii conţin doar fracţiuni slab electronegative, situate de la start spre catod. Imediat de la start spre catod se evidenţiează un grup de două pînă la patru fracţiuni, urmate de o zonă brun-roşcată, în care, la fel ca şi la embrioni, în urma unei hidrolize prelungite se pot observa două sau trei fracţiuni slabe. Cu excepţia liniei nr. 3, care conţine două fracţiuni, şi a liniei nr. 4, care conţine patru fracţiuni, toate celelalte linii evidenţiază în această regiune trei fracţiuni.

Grabar şi Daussant [13] au arătat că seminţele de orz conţin β-amilaza şi activitate de tip α, iar α-amilaza se găseşte doar în seminţele germinate. În lucrări anterioare am urmărit formele moleculare cu activitate amilolitică decelabile electroforetic în primele etape de creştere la porumb [14], grîu [15] şi alte cereale [16]. În toate cazurile s-au putut decela forme moleculare cu activitate amilolitică atît în formaţiunile seminţelor în repaus, cît şi în perioada germinării sau în primele frunze. Recent am demonstrat pe cale imunochimică, lucrînd pe porumb, ovăz şi grîu [17], că α-amilaza este o enzimă care apare în endospermi în perioada germinării şi nu se găseşte anterior în seminţe şi nici ulterior în frunze. În perioada germinării ea mai poate fi găsită, la porumb, în scuteli, iar la ovăz şi grîu, în rădăcini.

În lucrarea de faţă, lucrînd pe seminţe negerminate de porumb, activitatea amilolitică se datoreşte deci, în cea mai mare parte, β-amilazei,

precum şi altei sau altor enzime amilolitice de tip α [12], [16], dar al căror mod de acţiune nu a fost determinat. De aceea am folosit denumirea de „fracţiuni amilolitice" şi nu pe aceea de „forme moleculare".

Fosfataza acidă. În lucrări anterioare am arătat că fosfataza acidă din seminţele de grîu [18] şi de porumb [19] se găseşte sub forme moleculare electronegative şi electropozitive. Formele moleculare electropozitive posedă o activitate enzimatică foarte slabă şi, după germinare, se mai regăsesc doar timp de cîteva zile în endospermi. De aceea, în lucrarea de faţă ne-am ocupat numai de formele moleculare electronegative.

Enzimogramele fosfatazei acide din embrionii liniilor cercetate evidenţiază 4—6 fracţiuni (fig. 4 a). Ca aspect general, enzimogramele prezintă fracţiuni cu sarcină electronegativă mai pronunţată şi activitate slabă, precum şi fracţiuni slab electronegative cu activitate enzimatică mare. Cea mai eterogenă este fosfataza acidă din embrionii liniei nr. 7 la care se evidenţiază şase fracţiuni şi aceea din embrionii liniei nr. 1 la care se evidenţiază cinci fracţiuni; la embrionii celorlalte linii se evidenţiază patru fracţiuni ale fosfatazei acide.

Fosfataza acidă din endospermii liniilor analizate s-a evidenţiat sub forma a trei pînă la şase fracţiuni separabile după mobilitatea lor electroforetică (fig. 4 b). Constatăm că în endosperm, spre deosebire de embrion, fracţiunea cea mai activă este cea puternic electronegativă. Imaginea enzimogramelor este diferită de la o linie consangvinizată de porumb la alta, cu excepţia liniilor nr. 5 şi nr. 7, care se aseamănă între ele.

DISCUŢII

În lucrări anterioare am stabilit că grîul de toamnă F.1—63 şi grîul de primăvară Superelită Măgurele-7 evidenţiază aceleaşi spectre izoenzimatice pentru peroxidază [20], catalază [21], enzime amilolitice [15] şi fosfataza acidă [17] din seminţe, plantule şi endospermi, în perioada germinării şi în faza primelor trei frunze. Peroxidaza şi catalaza au fost cercetate şi pe cîţiva hibrizi de porumb, unde s-au evidenţiat de asemenea enzimograme asemănătoare [22], [23]. Totuşi, cînd s-a lucrat pe un număr mare de populaţii, hibrizi şi linii (aproximativ 100), s-au putut întocmi cîteva scheme ale formelor moleculare ale peroxidazei din seminţele de porumb [5]. Efron [24], lucrînd pe 23 linii de porumb autopolenizate o singură dată, le-a împărţit în 5 grupe distincte, în funcţie de aspectul enzimogramelor fosfatazei acide. Hunter şi Kaunenberg [25] au stabilit un „indice al diversificării", care reprezintă numărul de izoenzime ale unei enzime care erau diferite între două linii. Hibrizii produşi prin încrucişarea unor perechi de linii cu indice de diversificare mare au fost mai productivi comparativ cu cei obţinuţi din linii la care acest indice era mic. Totuşi, acest indice nu mai are valoare la hibrizii simpli folosiţi ca genitori. Datele obţinute în această lucrare ne arată două fapte importante, şi anume că liniile consangvinizate de porumb pot prezenta enzimograme specifice şi că cele patru enzime cercetate evidenţiază spectre izoenzimatice cu grade diferite de variabilitate în ordinea : peroxidaza > catalaza > fosfataza acidă şi enzimele amilolitice. Aceste fapte ne întăresc convingerea că variaţiile genetice care afectează activitatea unei enzime

se pot manifesta pe căi diferite. Ceea ce a reieşit clar este faptul că dacă analizăm hibrizi [22], [23] sau soiuri [5], evidenţiem enzimograme mult mai asemănătoare decît în cazul analizării liniilor consangvinizate. Aceasta arată că încrucişările multiple duc spre uniformizarea spectrelor izoenzimatice, iar autopolenizările determină segregări succesive care evidenţiază spectre izoenzimatice diferite, probabil cele ale soiurilor ancestrale.

CONCLUZII

1. Liniile consangvinizate de porumb pot evidenţia enzimograme specifice.

2. Spectrele izoenzimatice evidenţiate au grade diferite de variabilitate, în ordinea : peroxidaza > catalaza > fosfataza acidă şi enzimele amilolitice.

3. Consangvinizarea determină segregarea spectrelor izoenzimatice.

Prezentat la redacţie la 27 ianuarie 1973

Institutul de biochimie
Bucureşti
Institutul de cercetări pentru cereale şi plante tehnice — Fundulea, jud. Ilfov

THE MOLECULAR FORMS OF SOME ENZYMES IN THE SEEDS OF SOME MAIZE (*ZEA MAYS*) INBRED LINES

SUMMARY

The electrophoretical patterns of peroxidase, catalase, amylolytic enzymes and acid phosphatase in the seeds (embryo and endosperm) of seven maize inbred lines, consanguinlously-induced, were investigated. We have found that some consanguinlously-induced maize inbred lines may exhibit typical enzymograms. Their degree of variability decreases as follows : peroxidase, catalase, acid phosphatase and amylolytic enzymes.

Taking into account previously reported results, one can see that the enzymograms of consanguinlously-induced inbred lines are more different from each other, as compared with those of various hybrids and breeds. Therefore, interbreedings induce a similarity of isoenzyme patterns and self-pollinations result into successive segregations, accompanied by different isoenzymatic patterns, probably of the ancestral breeds.

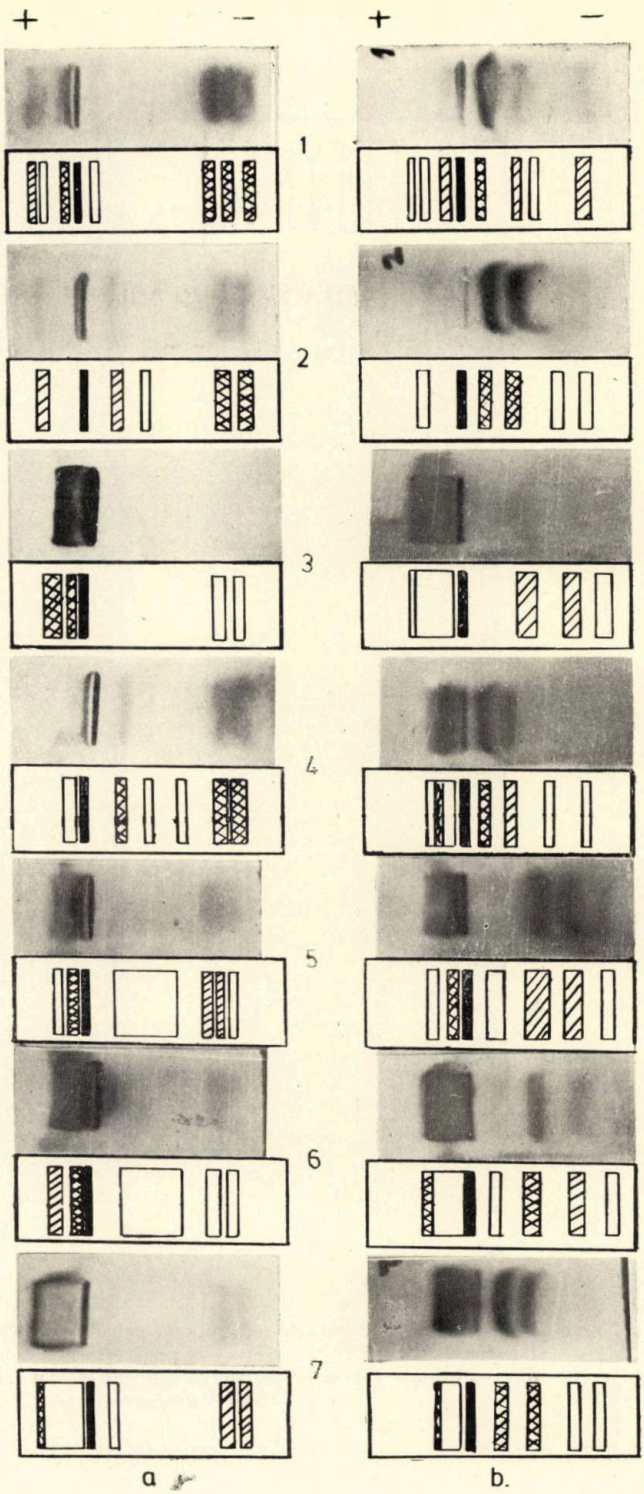


Fig. 1. — Enzimogramele obținute în gel de agar 1,5% (Difco) în soluție tampon acid boric-borax, pH = 8,4, pentru formele moleculare ale peroxidazei din embrionii (a) și endospermii (b) semințelor de porumb din șapte linii consangvinizate.

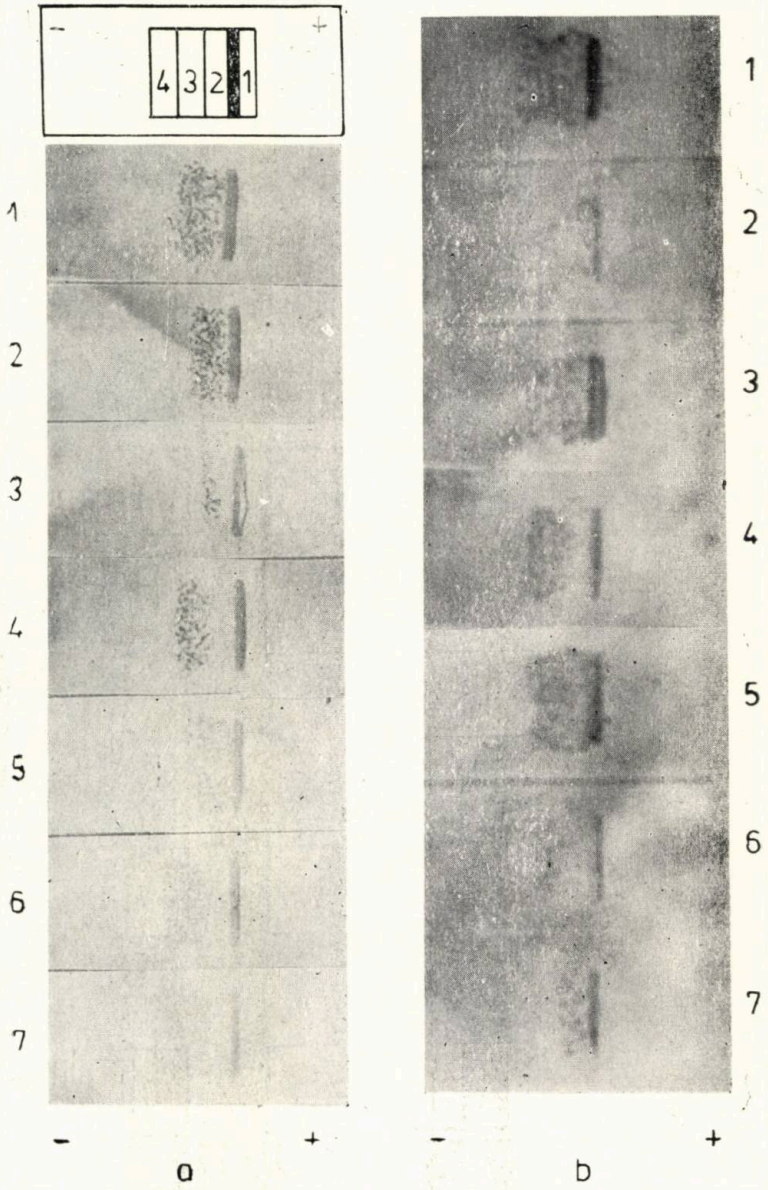


Fig. 2. — Enzimogramele obţinute în gel de agar 1,5% (NBC) în soluţie tampon acid boric-borax- pH=8,4, pentru formele moleculare ale catalazei din embrionii (a) şi endospermii (b) seminţelor de porumb din şapte linii consangvinizate.

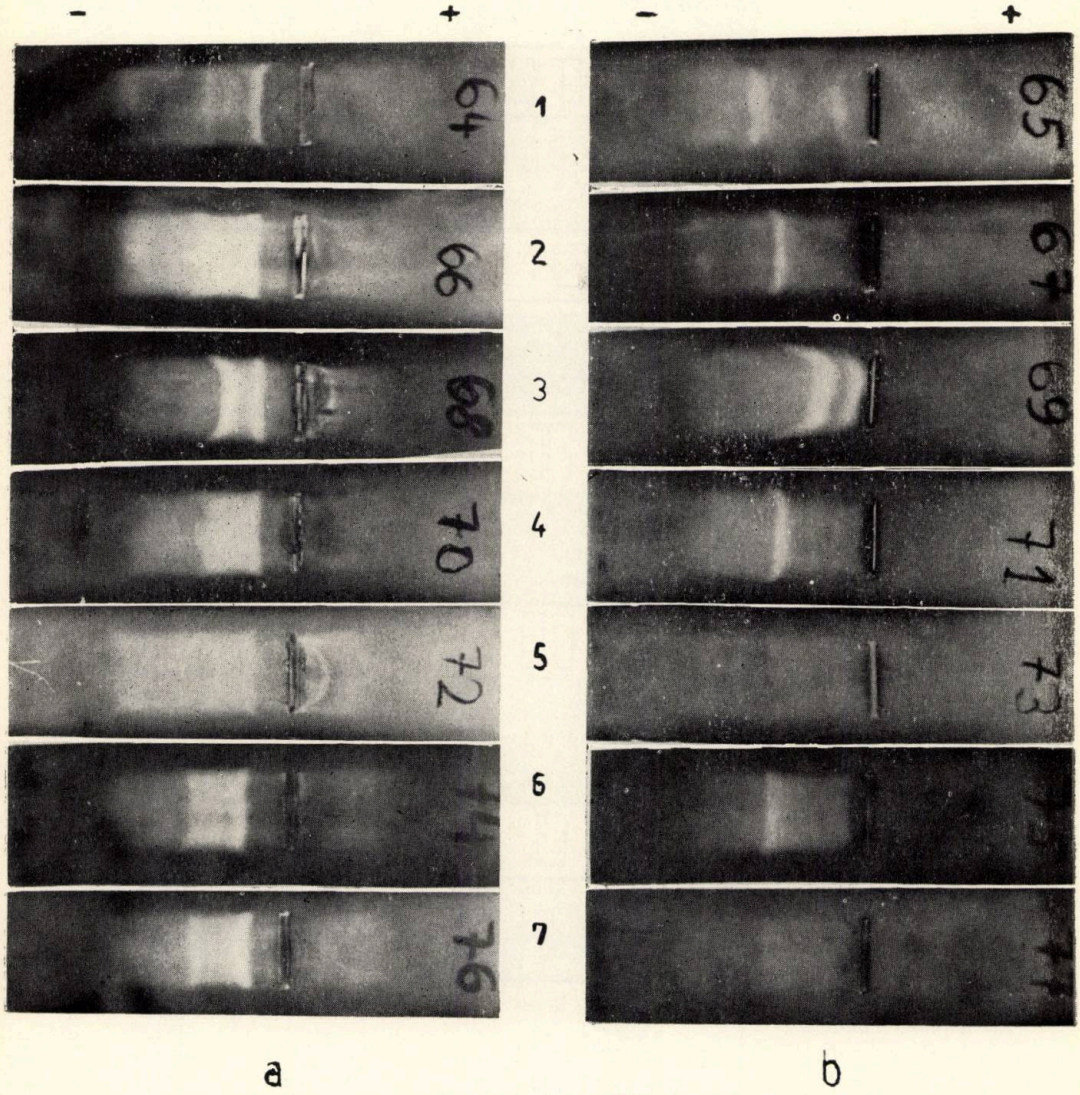


Fig. 3. — Enzimogramele obținute în gel de agar 1,25% cu adaos de amidon 0,5% în soluție tampon acid succinic-NaOH cu adaos de fosfat disodic pH = = 8, 4, pentru enzimele amilolitice din embrionii (a) și endospermii (b) semințelor de porumb din șapte linii consangvinizate.

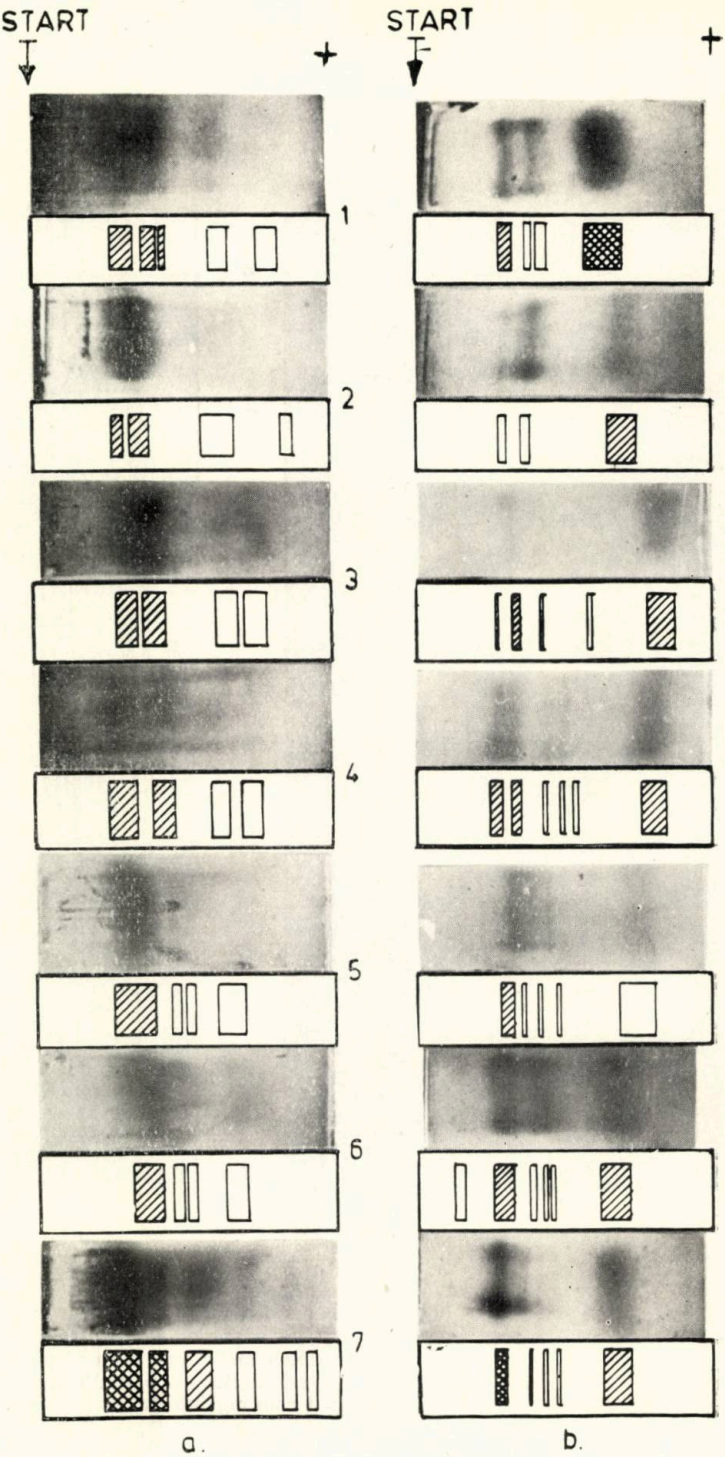


Fig. 4. — Enzimogramele obținute în gel de poliacrilamidă 5% în sistem vertical, în soluție tampon TRIS-EDTA. $Na_2-H_3BO_3$, pH = = 8,4,pentru fosfataza acidă din embrionii (a) și endospermii (b) semințelor de porumb din șapte linii consangvinizate.

BIBLIOGRAFIE

1. V. Jaaska, Izv. Akad. Nauk Estonskoi SSR, Biologhia, **18**, 170 (1969).
2. V. Jaaska, Izv. Akad. Nauk Estonskoi SSR, Biologhia, **20**, 202 (1971).
3. V. Jaaska, Izv. Akad. Nauk Estonskoi SSR, Biologhia, **21**, 61 (1972).
4. Y. E. Chu, Jap. J. Genet., **42**, 233 (1967).
5. T. Mureşan, I. Brad, O. Cosmin, Z. Marcu, Rev. roum. Biochim., **7**, 243 (1970).
6. B. B. Shahi, H. Morishima, H. I. Oka, Jap. J. Genet., **44**, 303 (1969).
7. D. R. Marshall, R. W. Allard, J. Hered., **60**, 17 (1969).
8. J.Uriel, Bull. Soc. Chim. Biol., **40**, 277 (1958).
9. M. Miholjčic, B. Večerek, 3-d Meeting of the FEBS, Warsaw, 1966, Abstracts, p. 326.
10. K. Hruska, Experientia, **22**, 625 (1966).
11. V. Gheţie, V. Micuşan, Analiza imunochimică, Edit. Academiei, Bucureşti, 1966, p. 322.
12. V. Alexandrescu, I. Călin, Rev. roum. Biochim., **6**, 171 (1969).
13. P. Grabar, J. Daussant, Cereal Chem., **41**, 523 (1964).
14. V. Alexandrescu, F. Mihăilescu, St. cerc. biochim., **12**, 315 (1969).
15. V. Alexandrescu, F. Mihăilescu, Rev. roum. Biochim., **7**, 3 (1970).
16. F. Mihăilescu, St. cerc. biochim., **13**, 285 (1970).
17. V. Alexandrescu, F. Mihăilescu, Rev. roum. Biochim., **10**, 89 (1973).
18. V. Alexandrescu, D. Popov, Rev. roum. Biochim., **7**, 85 (1970).
19. D. Popov, St. cerc. biochim., **12**, 377 (1969).
20. V. Alexandrescu, I. Hagima-Călin, St. cerc. biochim., **13**, 113 (1970).
21. V. Alexandrescu, Rev. roum. Biochim., **7**, 187 (1970).
22. V. Alexandrescu, D. Popov, Rev. roum. Biochim., **5**, 97 (1968).
23. V. Alexandrescu, F. Mihăilescu, Rev. roum. Biochim., **5**, 189 (1968).
24. Y. Efron, Biochem. Genet., **5**, 33 (1971).
25. R. Bruce Hunter, L. W. Kannenberg, Canad. J. Genet. Cytol., **13**, 649 (1971).

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 3, 243–250 (1973)

CONTROLUL METABOLIC ÎN TERAPIA HIPOGLICEMIANTĂ CU DERIVAȚI PIRAZOLICI

CORNELIA BĂCLEȘEANU, ZENAIDA COJOCARU și CONSTANTIN NISTOR

Rezumat. — S-a efectuat un studiu comparativ între tolbutamidă, maguan, 3,5-dimetil-pirazol și 1-carbamido-3,5-dimetil-pirazol, la nivelul unor căi din metabolismul glucidic, pentru stabilirea etapelor specifice de acțiune.

3,5-dimetil-pirazolul a produs depresia cert semnificativă a piruvatului și lactatului, cu creșterea hexochinazei și aldolazei.

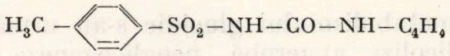
1-carbamido-3,5-dimetil-pirazolul instalează o creștere moderată a piruvatului și a hexochinazei și o scădere evidentă a nivelului aldolazei.

Descoperirea unor preparate antidiabetice, farmacodinamic active, a dus, încă înainte de cunoașterea insulinei, la găsirea unei game largi de produse cu acțiune hipoglicemiantă.

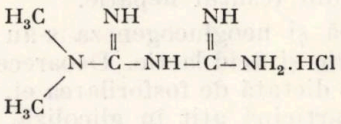
După Goldner [1], [2] un agent hipoglicemiant imită cît mai exact posibil mecanismul de acțiune al insulinei. Un mare număr de compuși cu diferite structuri s-au arătat capabili să exercite efecte hipoglicemiante; printre aceștia, recent se semnalează în literatură [3]—[5] derivații din seria 3,5-dimetil-pirazolului.

Astfel, 3,5-dimetil-pirazolul s-a dovedit a fi de aproximativ 50 de ori mai activ decît tolbutamidul, iar unii derivați N-acetilați chiar mai activi.

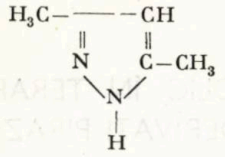
În vederea studiului unor relații între structură și acțiune, în funcție de natura radicalului acil, ne-am propus în această lucrare un studiu comparativ între tolbutamidă (N-p-toluen-sulfonil-N-butiluree), maguan (clorhidrat de N,N-dimetil-biguanidină) insulină, 3,5-dimetil-pirazol și 1-carbamido-3,5-dimetil-pirazol, la nivelul unor căi din metabolismul glucidic, pentru stabilirea etapelor specifice de acțiune.



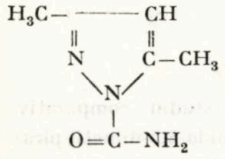
Tolbutamidă



Maguan



3,5-dimetil-pirazol



1-carbamido-3,5-dimetil-pirazol

Literatura de specialitate nu precizează acțiunea la nivel metabolic a derivaților din seria 3,5-dimetil-pirazolului, nici chiar a 3,5-dimetil-pirazolului însuși.

MATERIAL ȘI METODE

Experiențele s-au efectuat pe șobolani albi masculi, tineri în greutate de 150—200 g, repartizați în loturi după cum urmează :

Lotul I martor ; lotul II, normali, tratați cu tolbutamidă ; lotul III, normali, tratați cu maguan ; lotul IV, normali, tratați cu insulină ; lotul V, normali, tratați cu 3,5-dimetil-pirazol (compus I).

Numai pentru anumiți indicatori s-a utilizat și un lot de animale normale tratate cu 1-carbamido-3,5-dimetil-pirazol (compus II).

Tolbutamida și maguanul utilizate provin de la Uzina de medicamente București, iar derivații pirazolici au fost sintetizați de noi [6].

Administrarea medicamentelor s-a făcut pe cale intravenoasă, și anume : insulina 4 U.I./kg greutate corporală, tolbutamida 125 mg/kg greutate corporală, maguanul și derivații pirazolici în doze echivalente tolbutamidei. Sacrificarea animalelor s-a făcut după 4 zile de la administrare. Ficatul prelevat a fost omogenizat la gheață, în omogenizatorul Potter-Ellhjem.

Din etapele metabolismului glucidic s-au urmărit glicogenogeneza și glicogenoliza, glicoliza anaerobă, neoglicogeneza. Etapele glicogenogenezei și ale glicogenolizei s-au studiat pe baza urmăririi nivelului glicemiei și glicogenului din țesutul hepatic.

Glicoliza anaerobă și neoglucogeneza s-au evaluat prin urmărirea cataboliților acid piruvic și acid lactic. Deoarece angajarea glucozei în procesul metabolic este dictată de fosforilarea ei, proces catalizat de hexokinază, iar aldolaza participă atît în glicoliză, cît și în neoglucogeneză am luat în atenția noastră și comportarea acestor două enzime.

Interpretarea rezultatelor experimentale s-a făcut pe baza următorilor indicatori statistici: media aritmetică (X), dispersia, coeficientul de variabilitate (c.v.), testul t şi probabilitatea (p). Dozarea glucozei în sîngele recoltat din vena cozii (0,002 ml) s-a efectuat după micrometoda Somogy [7]. Determinarea conţinutului de glicogen s-a realizat prin o prealabilă hidroliză alcalină a ţesutului hepatic.

Pentru urmărirea acidului piruvic am utilizat tehnica adaptată de noi după principiul preconizat de Legaudt şi Demare [8], care se bazează pe reacţia dintre cetoacizi şi tiosemicarbazidă, cu formarea tiosemicarbazonei cetoacidului respectiv, ce modifică densitatea optică în

Tabela 1

Modificarea constituenţilor glucidici

Glicemia mg/100 ml sînge

Martor	M + Tolbutamidă	M + Maguan	M + Insulină	M + Pirazol I
76	58	88	86	136
62	57	98	57	90
56	56	94	42	70
66	55	98	58	120
80	90	89	49	88
69	171	80	44	80
114	236	95	39	88
104	104	117	45	87
98	58	88	52	74
119	57	137	14	73
94	61	138	29	83
94	64	93	57	72
76	91	97	32	89
62	94	97	41	74
92	62	85	36	80
102	52	92	41	88
76	59	99	47	87
77	57	96	42	115
92	56	98	43	82
94	48	94	52	110
102	60	80	39	91
114	55	82	28	79
66	90	69	25	122
70	83	37	30	74
75	58	60	—	132
70	64	97	—	95
—	69	82	—	90
—	—	69	—	90
M 85	82	91	43	89
±19,02	49,5	18,5	14,5	5,8
es 3,62	9,4	3,5	2,9	1,0
cv% 22,5	60,3	20,5	33,9	6,5
t —	0,3	1,1	9,5	0,8
p —	0,5	0,5 > P > 0,1	0,01	0,5 > P > 0,1

U.V. Adaptarea acestei metode rapide constă în aplicarea ei pe omogenate tisulare.

Acidul lactic s-a evaluat după metoda Barker [9]. Estimarea activităţii hexokinazei a urmat tehnica Kohn [10], iar a aldolazei pro-

cedeul descris de Herbert [11], reacţia finală P_1 după tehnica Lowry [12]. Exprimarea activităţilor enzimatice s-a raportat la mg de proteină, estimată după metoda Gornall [13].

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Nivelul glicemiei (tabela 1) prezintă la lotul martor valoarea medie de 85 mg%. Faţă de această valoare, tolbutamida manifestă o scădere la 82 mg%, maguanul o tendinţă slabă de creştere la 91 mg %, iar lotul tratat cu 3,5-dimetil-pirazol, care prezintă omogenitate semnificativă, se înscrie între acţiunea tolbutamidei şi aceea a maguanului (89 mg%). Insulina îşi manifestă detaşat acţiunea hipoglicemiantă (43 mg% glucoză).

Tabela 2

Glicogenul din ficat (μg glucoză/100 mg ţesut umed)

Martor	M + Tolbutamida	M + Maguan	M+Pirazol I
610	750	660	1400
400	760	1290	900
568	1312	2000	900
750	1380	970	1100
550	1425	752	1200
576	1627	808	1171
1072	1032	1330	—
848	849	2120	
2500	988	1000	
660	1328	660	
580	850	—	
580	1205		
400	—		
820			
796			
364			
500			
840			
688			
850			
1248			
1056			
1144			
1872			
1504			
1600			
1472			
1648			
704			
M 974	1192	1159	1095
± 926	300	502	193
es 80,3	86,8	158,8	78,7
cv% 43,7	25,2	43,3	17,6
t—	1,8	1,0	0,75
p—	0,5>P>0,1	0,5>P>0,1	0,01<P<0,02

Privind efectele terapiei urmărite de noi asupra glicogenolizei şi glicogenogenezei, remarcăm inserarea valorilor glicogenului (tabela 2),

între aceleaşi limite ca şi în cazul glicemiei; faţă de lotul martor (974 μg glucoză %), tolbutamida (1 192 μg glucoză %), maguanul (1 159 μg glucoză %), 3,5-dimetil-pirazolul instalează la şobolanii normali o creştere a glicogenului la 1 195 /μg glucoză,%. Acţiunea este justificată de o posibilitate $0,01<P<0,02$.

La nivelul glicolizei anaerobe asistăm la modificări pregnante ale lactatului (tabela 3), producîndu-se, sub influenţa tratamentului cu 3,5-dimetil-pirazol, o scădere de la 531,5 la 119,7 μg lactat/100 mg proteină. Acţiunea este justificată de o posibilitate de 99% P. Comparativ cu tolbutamida, este cea mai evidentă acţiune depresivă înscrisă la acest nivel.

Tabela 3

Modificarea glicolizei anaerobe. Acidul lactic din ficat (μg/mg proteină)

Martor	M + Tolbutamidă	M + Maguan	M + Insulină	M + Pirazol I
783,6	391,4	362,5	373,6	113,6
718,1	451,1	372,3	311,3	194,8
760,2	352,0	363,7	586,9	87,1
760,8	331,0	374,2	879,2	82,1
235,6	576,7	362,8	685,3	110,2
347,5	451,8	336,7	312,5	112,5
474,8	318,0	389,0	343,6	164,2
818,1	601,5	359,0	315,8	84,3
737,7	281,6	285,3	481,2	129,4
163,7	586,4	166,6	—	—
206,3	518,8	348,9		
539,4	325,0	369,7		
625,3	331,0	375,8		
628,2	456,2	389,0		
549,5	376,9	359,0		
561,6	—	385,3		
M 531,5	435,8	348,9	389,2	119,7
±212,0	101,2	53,6	104,8	38,2
es 47,4	22,6	13,4	40,3	12,7
cv % 39,8	23,2	15,3	27,1	31,9
t—	1,8	3,3	1,6	5,7
p—	$0,05<P<0,1$	0,01	0,1	0,01

Acidul piruvic [14] la nivelul hepatic (tabela 4) scade sub acţiunea 3,5-dimetil-pirazolului de la 32,07 μg piruvat la lotul martor şi la 21,0 μg piruvat la lotul tratat cu derivat pirazolic. Această depresie este net superioară aceleia a tolbutamidei şi insulinei. Remarcăm în comparaţie cu maguanul o diferenţiere evidentă, ultimul producînd deprimarea severă a acidului piruvic şi creşterea acidului lactic. La acelaşi nivel se constată o diferenţiere şi în comportamentul celor doi derivaţi pirazolici; compusul I, produce scăderea lactatului şi a piruvatului, iar compusul II, creşterea piruvatului.

Hexokinaza (tabela 5), enzima cheie a glicolizei, înscrie sub acţiunea derivaţilor pirazolici (I şi II) creşteri semnificative, indice al unei active metabolizări pe calea glicolizei. Comportarea derivatului pirazolic de tip II exprimă o acţiune favorizantă, înscrisă la nivele diferite.

Tabela 4

Acidul piruvic din ficat (µg piruvat Na/mg țesut)

Martor	M+ Tolbutamida	M+Maguan	M+ Insulină	M+Pirazol I	M+Pirazol II
30,0	27,04	5,44	24,6	25,0	44,7
30,4	27,02	5,44	20,1	19,6	43,2
31,2	27,03	5,50	23,2	20,1	40,5
26,4	27,05	7,80	22,2	21,1	27,2
31,2	27,00	8,40	25,4	20,2	28,6
26,4	26,99	7,70	24,2	—	36,4
26,4	28,40	6,70	23,6	—	25,4
24,2	28,02	6,90	31,4	—	28,3
24,3	28,03	8,50	26,5	—	41,2
28,2	27,05	8,70	—	—	—
27,0	27,08	—			
32,8					
39,2					
28,6					
28,4					
31,4					
36,2					
24,3					
M 32,07	27,15	7,20	24,57	21,0	35,05
±4,75	0,40	1,05	3,08	2,20	7,82
es 1,12	0,12	0,33	1,02	0,98	2,60
cv% 14,17	1,49	14,71	12,56	10,50	22,32
t —	3,29	16,25	3,71	5,42	1,23
p —	0,01	0,01	0,01	0,01	0,1

Tabela 5

Hexokinaza din ficat (µ moli glucoză/mg proteină)

Martor	M+ Tolbutamidă	M+ Maguan	M + Pirazol I	M + Pirazol II
3,3	2,3	2,7	8,2	6,8
3,0	9,8	1,3	7,7	2,7
0,7	11,5	0,35	7,3	4,5
1,7	11,4	0,25	8,1	6,5
1,6	12,7	0,50	9,7	3,8
5,4	13,3	0,62	7,9	—
2,2	11,8	0,60		
1,5	11,5	3,02		
3,6		2,70		
3,1				
3,2				
10,4				
9,4				
8,0				
2,2				
1,3				
1,4				
1,2				
M 3,51	10,54	1,20	8,44	4,86
±2,53	3,52	1,04	0,61	3,5

Tabela 6

Aldolaza din ficat (μmoli P/mg proteină)

Martor	M + Tolbutamidă	M + Maguan	M + Insulină	M + Pirazol I	M + Pirazol II
M 0,091	0,067	0,079	0,02	0,104	0,043
cv % 2,7	7,0	3,6	9,6	2,3	0,9

Nivelul aldolazei (tabela 6), sub efectul 3,5-dimetil-pirazolului se ridică la 0,10 μ moli/mg proteină, întrecînd cu mult acțiunea insuline și a tolbutamidei. Derivatul pirazolic II se comportă mai puțin semnificativ, acțiunea sa este însă superioară celei exercitate de insulină. Răspunsul aldolazei la administrarea derivaților pirazolici ar putea să explice activitatea mai intensă a acestei enzime pe calea neoglucogenezei.

Pentru elucidarea mecanismelor în măsură să explice comportarea derivaților pirazolici, sînt în curs cercetări care extind studiul la animale diabetice, cît și asupra altor parametri biochimici.

CONCLUZII

Tratamentul șobolanilor normali, pe cale intravenoasă cu 3,5-dimetil-pirazol (compus I) și 1-carbamido-3,5-dimetil-pirazol (compus II), provoacă :

— modificări nesemnificative la nivelul glicemiei;

— o ușoară creștere a glicogenului hepatic sub acțiunea compusului I;

— comportări diferite la nivelul cataboliților glicolizei anaerobe și-a enzimelor studiate;

— depresia cert semnificativă a piruvatului și lactatului, cu creșterea activității hexokinazei și aldolazei, în cazul 3,5-dimetil-pirazolului;

— creșterea moderată a piruvatului și activității hexochinazei și o scădere evidentă a activității aldolazei, în cazul 1-carbamido-3,5-dimetil-pirazolului.

Tratamentul șobolanilor normali cu tolbutamidă și maguan provoacă :

— o ușoară tendință de scădere a glicemiei, în cazul tolbutamidei și o ușoară tendință de creștere a glicemiei în cazul maguanului;

— o deprimare severă a acidului piruvic și creșterea acidului lactic în cazul maguanului.

Prezentat la redacție la 16 ianuarie 1973

Disciplina de biochimie farmaceutică și clinică,
Facultatea de farmacie I.M.F. Cluj,
Disciplina de chimie farmaceutică I.M.F.
Tg.-Mureș,
Institutul oncologic Cluj

METABOLIC CONTROL IN THE HYPOGLYCEMIANTE THERAPY WITH PYRAZOLE DERIVATIVES

SUMMARY

A comparative study was effectuated between tolbutamide, maguan, 3,5-dimethyl-pyrazole and 1-carbamido-3,5-dimethyl-pyrazole, at the level of some ways of the glucidic metabolism, for the establishing of specific stages of the action.

3,5-dimethyl-pyrazole produced a rigorously significative depression of pyruvate and lactate, with the increasing of hexokinase and aldolase.

1-carbamido-3,5-dimethyl-pyrazole leads to the onset of a moderate increase of the pyruvate and hexokinase and of an obvious decrease of the aldolase level.

BIBLIOGRAFIE

1. M. J. Goldner, Arch. Intern. Med., **102**, 830 (1958).
2. M. J. Goldner, A. Gomori, Endocrinol., **35**, 241 (1944).
3. J. Dulin, M. Wright, C. A., **61**, 1607, 30 (1964).
4. A. Schmit, A. Forist, C. A., **61**, 1607, 30 (1964).
5. A. Schmit, Farmaco (Pavia) Ediz. Sci., **21**, 329 (1966).
6. Z. Cojocaru, C. Bacleseanu, Rev. Med. (Tg. Mureș), **XVII**, 415 (1971).
7. W. Somoghy, N. Nelson, J. Biol. Chem., **153**, 375 (1944).
8. J. Legaudt, J. Demare, Bull. Soc. Chim. Biol., **48**, 992 (1966).
9. S. B. Barker, Biochem. J., **60**, 1798 (1955).
10. B. Kohn, R. Mirski, Science, **106**, 148 (1947).
11. D. Herbert, Biochem. J., **34**, 1108 (1940).
12. O. H. Lowry, J. Biol. Chem., **241**, 2268 (1966).
13. A. G. Gornall, C. L. Bardaul, M. M. David, J. Biol. Chem., **177**, 2123 (1949).
14. C. Bacleseanu, Teză de doctorat, I.M.F. Cluj, p. 116 (1969).

STUD. CERC. BIOCHIM., 16, 3, 251–260 (1973)

CARACTERIZAREA IMUNOCHIMICĂ A MITOCONDRIILOR DIN FICATUL UMAN

GHEORGHE BENGA

Rezumat. — S-a efectuat o analiză imunochimică a mitocondriilor izolate din fragmente de ţesut hepatic uman prelevate prin biopsie chirurgicală. Antigenele mitocondriale solubilizate cu dezoxicolat de sodiu au fost fracţionate prin cromatografie pe TEAE-celuloză, DEAE-celuloză şi prin filtrare în gel de Sephadex G-150. Majoritatea proteinelor mitocondriale au fost lipoproteine lipsite de proprietăţi antigenice. Prin imunoelectroforeză s-au evidenţiat nouă componente antigenice mitocondriale. S-au observat modificări în condiţii patologice (icter mecanic prelungit). Nu s-a putut detecta o înrudire antigenică între mitocondriile din ficatul uman şi cele de şobolan. Este discutată importanţa caracterizării imunochimice a mitocondriilor din ficatul uman din punctul de vedere al anticorpilor „antimitocondriali".

Primele studii asupra antigenicităţii fracţiunilor subcelulare hepatice au fost făcute, în 1941, de Furth şi Kabat (cit. de [11]), care identifică antigene specifice diferitelor fracţiuni, prin reacţia de fixare a complementului. Acest gen de studii a căpătat o dezvoltare mai mare din 1958, după introducerea metodelor de difuziune în gel de agar. Astfel, Perlmann şi D'Amelio, ca şi Vogt, studiază distribuţia antigenelor solubile în microzomi, mitocondrii şi supernatantul celular (cit. de [24]); D'Amelio şi colab. [12] evidenţiază componentele specifice mitocondriilor din ficatul de şobolan, în timp ce Lundqwist şi Perlmann [21] studiază separat antigenele microzomale din hepatocitele şi din celulele sistemului reticuloendotelial hepatic. Şelariu studiază relaţiile dintre antigenele solubile mitocondriale şi citoplasmatice din ficatul şi creierul de şobolan, folosind ca procedeu de extracţie îngheţarea-dezgheţarea [24], [25].

Componentele antigenice ale ficatului uman sînt mai puţin studiate. În afara studiilor electroforetice folosind ca antigen ţesutul hepatic (trecute în revistă de [11]), primul studiu asupra componentelor antigenice ale fracţiunilor subcelulare ale ficatului uman este cel al lui Chordi şi colab. [11]. Lucrînd însă cu ţesut recoltat de la cadavre, autorii exprimă rezerve faţă de rezultatele obţinute pe fracţiunea mitocondrială, cunoscîndu-se rapiditatea cu care mitocondriile se alterează post-mortem.

Caracterizarea imunochimică a mitocondriilor din ficatul uman prezintă importanţă şi din punctul de vedere al anticorpilor „antimitocondriali", descrişi în ciroza biliară primară şi în alte boli hepatice [7]–[9].

La detectarea acestor anticorpi se utilizează mitocondrii de şobolan, în timp ce mitocondriile din ficatul uman prezintă particularităţi structurale şi funcţionale prin care se deosebesc de cele de şobolan [4]—[6].

MATERIAL ŞI METODE

1. *Prepararea antigenelor mitocondriale.* Mitocondriile s-au izolat din fragmente de ţesut hepatic (circa 0,5—1 g) prelevate prin biopsie intraoperatorie de la subiecţi supuşi unor intervenţii pe abdomen (pentru ulcere gastrice sau duodenale, ictere de diferite cauze). Ţesutul a fost introdus imediat după recoltare în soluţie de zaharoză 250 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, EDTA 2 mM (ZTE)*, transportat la 0° pînă în laborator (15—30 min), unde a fost omogenizat într-un omogenizator de sticlă cu pistil de teflon, acţionat de un motor la 1000 ture/min. Omogenatul (10% în ZTE) s-a centrifugat 10 minute la 600 g, apoi supernatantul s-a centrifugat la 8000 g timp de 10 minute pentru sedimentarea mitocondriilor. Peletele mitocondriale s-au spălat de două ori în acelaşi mediu şi s-au suspendat final în soluţie de zaharoză 75 mM, manitol 225 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), la o concentraţie proteică de circa 20 mg/ml. Suspensia de mitocondrii s-a diluat cu zaharoză 250 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 7, 4), aducîndu-se la o concentraţie proteică de 3—5 mg/ml şi s-a amestecat cu un volum egal de adjuvant complet Difco.

2. *Prepararea serului antimitocondrial*: S-au folosit iepuri de rasă Cincilla, de 2,5—3 kg, repartizaţi în două loturi de cîte 4 animale. La lotul de experienţă s-a administrat intramuscular antigenul mitocondrial în trei serii de inoculări, în următoarele doze (exprimate în mg proteină mitocondrială): seria I: 6,5 mg (ziua 1), 6 mg (ziua 12), 12 mg (ziua 27). După o pauză de 6 săptămîni s-a administrat seria II: 40 mg (ziua 1), 15 mg (ziua 14), iar după alte 10 săptămîni a urmat seria III: 5,5 mg (ziua 1), 12 mg (ziua 14), 10 mg (ziua 21) şi 1,5 mg intravenos fără adjuvant Freund (ziua 35). La 7 zile de la ultima inoculare s-a efectuat o sîngerare de probă, iar după încă 2 zile sîngerarea totală. Serul s-a introdus în fiole sterile de 2—5 ml şi s-a păstrat la frigider la 4°C. Lotul martor a primit în aceleaşi zile un volum egal de zaharoză şi adjuvant Freund complet, injectate intramuscular. Apariţia anticorpilor s-a urmărit prin dublă difuziune în gel de agar şi aglutinare pe lamă. Imunizarea s-a făcut pînă cînd s-a observat că titrul anticorpilor nu mai creşte.

3. *Concentrarea serului.* La 5 ml ser s-a adăugat 5 ml apă distilată şi s-a precipitat cu o soluţie saturată de sulfat de amoniu (ajustată la pH = 7,4) adăugată în picături, pînă la saturare fracţionară de 0,4. Precipitarea s-a efectuat la 4°C, pe agitator magnetic. S-a lăsat apoi în repaus la rece 15 minute, apoi s-a centrifugat la 4°C, timp de 20 minute la 6 000 ture/min. Supernatantul s-a îndepărtat, iar sedimentul s-a spălat de două ori cu sulfat de amoniu 40% şi s-a recentrifugat. În final s-a

* S-au folosit prescurtările: ZTE — soluţie de zaharoză 250 mM + Tris-HCl 10 mM + EDTA 2 mM, pH = 7,4; DOC — dezoxicolat de sodiu.

dizolvat în volumul minim de apă distilată (maxim 1 ml) şi s-a dializat faţă de soluţia de NaCl 0,9% pînă la îndepărtarea SO_4^{2-} (control cu $BaCl_2$). Concentratul s-a păstrat la rece (4°C).

4. *Extragerea componentelor solubile din mitocondrii.* Mitocondriile au fost liofilizate a doua zi după prepararea suspensiei şi s-au păstrat în această stare pînă la testare. Conţinutul mai multor fiole (circa 70 mg proteină mitocondrială) a fost reluat în 5—6 ml tampon Tris-HCl 50 mM (pH = 8) şi s-a dializat 24 ore la 4°C faţă de acelaşi tampon pentru a se îndepărta zaharoza şi manitolul. S-a adăugat apoi dezoxicolat de sodiu pînă la o concentraţie finală de 0,5%, s-a incubat la 37°C timp de o oră, apoi s-a centrifugat 15 minute la 21000 g. Supernatantul s-a dializat faţă de tampon Tris-HCl 50 mM (pH = 8) timp de 48 ore cu schimbarea repetată a lichidului de dializă şi s-a folosit apoi cromatografie pe schimbători de ioni celulozici şi filtrare în gel. S-a numit acesta extractul 1 (DOC 0,5% solubil).

Sedimentul s-a resuspendat în 1 ml tampon şi s-a tratat cu DOC la o concentraţie finală de 5%, după care s-a repetat centrifugarea. Supernatantul (extractul 2, DOC 5% solubil) s-a dializat la fel ca mai sus, iar sedimentul a fost spălat de două ori cu tampon Tris şi în final s-a reluat cu 1 ml apă distilată şi s-a folosit pentru absorbţia serului în unele experienţe.

5. *Analize chimice şi imunologice.* Dozarea proteinelor mitocondriale s-a făcut prin metoda Lowry [19], iar în fracţiunile colectate de pe coloane prin absorbţie în ultraviolet la 280 nm. Curba de etalonare s-a stabilit cu albumină serică bovină.

Dubla difuzie în gel de agar şi imunoelectroforeza s-au făcut după tehnicile descrise de Gheţie [17]. Electroforeza s-a făcut la pH 8, 6, cu tampon veronal-veronal sodic (concentraţia 0,05 M în cuvă şi 0,017 în plăci), la un potenţial de 10 V/cm, intensitatea curentului de 1 mA/cm, timpul de migrare fiind 45 minute la temperatura camerei, pe plăci de 75/75 mm. Prelucrarea plăcilor în continuare s-a făcut prin metodele uzuale [17].

REZULTATE

Analiza antigenelor mitocondriale prin dublă difuzie în gel. Prin această tehnică s-a urmărit apariţia anticorpilor în serul diferitelor animale, s-a stabilit raportul optim antigen-anticorp pentru analiza imunoelectroforetică, numărul componentelor antigenice detectabile prin diferite tratamente ale mitocondriilor şi s-a urmărit existenţa unei comunităţi antigenice între mitocondriile din ficatul de om şi cel de şobolan.

Cele mai puternice linii de precipitare s-au obţinut utilizînd antiserul nediluat şi la o concentraţie proteică a antigenelor mitocondriale de 15—30 mg/ml. Prin lizarea mitocondriilor prin şoc osmotic, tratare cu dezoxicolat de Na (1mg/mg proteină mitocondrială) şi lubrol WX (0,5 mg/mg proteină), cele mai multe şi mai intense linii de precipitare s-au obţinut în urma tratamentului cu dezoxicolat, cu care s-au detectat

șase componente antigenice, față de patru linii de precipitare obținute cu lubrol și două linii cu mitocondriile lizate prin șoc osmotic (fig. 1).

Prin dublă difuzie în gel nu s-a putut detecta o înrudire antigenică între mitocondriile din ficatul uman și cele de șobolan, după cum se observă în figura 2. După sîngerarea la alb s-a urmărit existența unor anticorpi autologi în serul iepurilor față de mitocondriile hepatice. Nu s-a observat

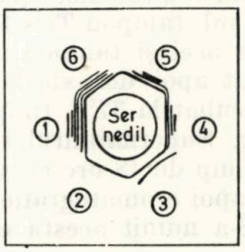
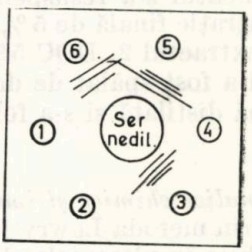


Fig. 1. — Schema liniilor de precipitare obținute după diferite tratamente ale mitocondriilor.

1 = 12 mg proteine mitocondriale/ml, tratare cu DOC 0,5%;
2 = 6 mg proteine/ml, tratament: șoc osmotic;
3 = 12 mg proteine/ml, șoc osmotic;
4 = 6 mg proteine/ml, tratare cu lubrol WX 0,5%;
5 = 12 mg proteine/ml, tratare cu lubrol WX 0,5%;
6 = 6 mg proteine/ml, tratare cu DOC 0,5%.

Fig. 2. — Schema liniilor de precipitare obținute cu mitocondrii din ficatul uman, supernatantul din ficatul uman, mitocondrii din ficatul de șobolan și cu mitocondrii izolate din ficatul iepurilor imunizați.

1 = mitocondrii din ficat de șobolan, tratament: șoc osmotic;
2 = mitocondrii din ficat de șobolan tratare cu DOC;
3 = mitocondrii din ficat uman, tratare cu DOC;
4 = mitocondrii din ficat de iepure, tratare cu DOC;
5 = mitocondrii din ficat uman, tratare cu DOC;
6 = supernatant ficat uman.



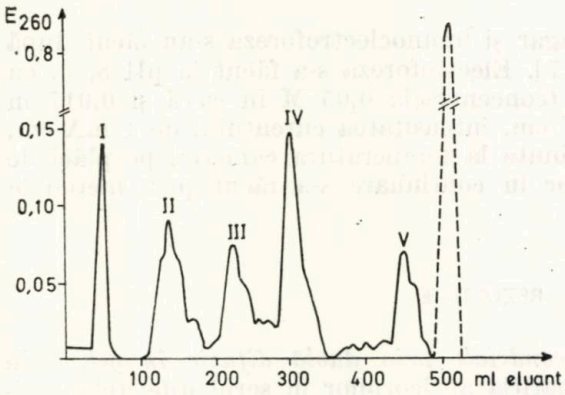


Fig. 3. — Separarea fracțiunilor extractului mitocondrial DOC 0,5% solubil (extractul 1) pe TEAE-celuloză.

Cromatografia s-a realizat pe o coloană de 173/22 mm pe care s-au cromatografiat 50 mg proteine mitocondriale. S-a efectuat o eluție discontinuă, folosind următoarele tampoane: I: Tris-HCl 50 mM (pH = 8); II: TrisHCl 50mM (pH = 8) + NaCl 50 mM; III: Tris-HCl 50mM (pH = 8) + NaCl 100 mM; IV: Tris-HCl 50 mM (pH = 8) + NaCl 200mM; V: Tris-HCl 50 mM (pH = 8) + NaCl 500 mM; apoi eluție cu NaOH 0,2 N.

nici o linie de precipitare (fig. 2, 4). Dealtfel absența unor anticorpi față de propriile mitocondrii hepatice este confirmată de lipsa unui efect inhibitor al antiserului asupra respirației mitocondriilor de iepure măsurată prin manometrie convențională (C. Benga, în pregătire).

Fracționarea componentelor solubile mitocondriale

Extractul 1 (DOC 0,5% solubil) al mitocondriilor s-a cromatografiat pe TEAE-celuloză, obținîndu-se curba de eluție din figura 2 pe care se disting cinci piscuri de înălțime redusă. Majoritatea materialului rămîne pe

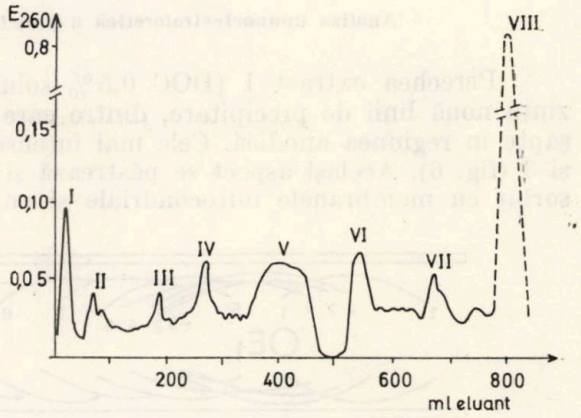


Fig. 4.— Fracţionarea extractului mitocondrial pe DEAE-celuloză.

S-au cromatografiat 8 mg proteine mitocondriale pe o coloană de 120/20 mm cu tampon fosfat 0,02 M (pH = 6,5) în gradient continuu de Na Cl, în sistemul con-sferă [17].

coloană, de unde se eluează cu NaOH 0,2 N, cînd se observă o turbiditate marcată, ceea ce denotă existenţa unor lipoproteine în suspensie.

Considerînd cromatografia pe TEAE-celuloză la pH = 8, în gradient discontinuu de NaCl ca inadecvată pentru fracţionarea mitocondriilor din ficatul uman, am încercat o fracţionare pe CM-celuloză, cu tampon de acid acetic-acetat de Na la pH = 5,5. Punînd însă extractul 1 la dializă faţă de acest tampon, majoritatea proteinelor au precipitat. S-a suspendat precipitatul în tampon fosfat 0,02 M (pH = 8) şi s-au fracţionat proteinele trecute în soluţie prin cromatografie pe DEAE-celuloză şi filtrare în gel de Sephadex G-150.

Aspectul curbei de eluţie la cromatografia pe DEAE-celuloză, cu tampon fosfat 0,02 M (pH = 6,5), în gradient continuu de NaCl (sistemul con-sferă) este redat în figura 4. S-au obţinut cinci piscuri de înălţime re-

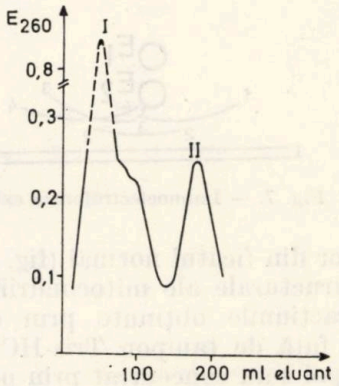


Fig. 5. —Fracţionarea extractului mitocondrial pe Sephadex G-150.

6 mg proteine s-au trecut pe o coloană de 800/10mm cu tampon fosfat 0,1 M (pH = 8) cu NaCl 0,15 M.

dusă în cursul gradientului, cîte un pisc la NaCl 0,5 M şi la 1 M şi majoritatea proteinelor s-a eluat la sfîrşit cu NaOH sub formă de lipoproteine.

La filtrarea în gel de Sephadex G-150 s-au obţinut în principal două piscuri, în primul fiind eluate componentele lipoproteice (care în cromatografie erau eluate doar cu NaOH), ceea ce denotă greutatea lor moleculară mare, în jur de 100 000 (fig. 5).

Analiza imunoelectroforetică a proteinelor mitocondriale

Perechea extract 1 (DOC 0,5% solubil)-ser antimitocondrial prezintă nouă linii de precipitare, dintre care două în regiunea catodică şi şapte în regiunea anodică. Cele mai intense linii sînt cele notate cu 1,2 şi 3 (fig. 6). Acelaşi aspect se păstrează şi cu serul antimitocondrial absorbit cu membranele mitocondriale şi cu concentratul în globuline al

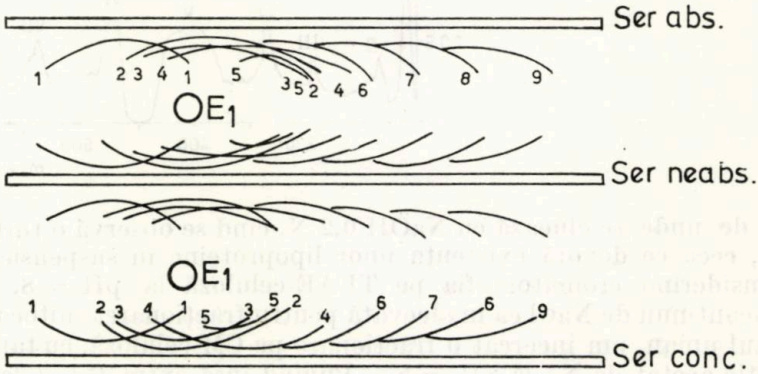


Fig. 6. — Imunoelectroforeza proteinelor mitocondriale.
E_1 = extractul DOC 0,5% solubil.

serului. După cum se observă în figura 7 la concentraţia de dezoxicolat de 5% (extractul 2) nu se solubilizează noi componente antigenice.

Un aspect interesant este următorul: extractul cu DOC 0,5% al mitocondriilor separate de la un bolnav cu icter mecanic prelungit prezintă o linie de precipitare 1-diferită de cele observate cu extractul 1 al mito-

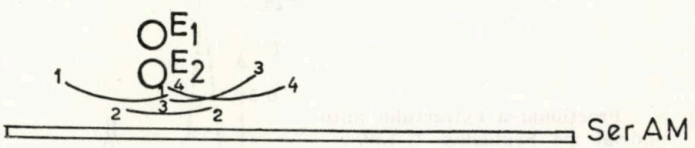


Fig. 7. — Imunoelectroforeza extractelor DOC 0,5% (1) şi DOC 5% (2).

condriilor din ficatul normal (fig. 8). Aceasta indică existenţa unor modificări structurale ale mitocondriilor în cazul icterelor prelungite.

Fracţiunile obţinute prin cromatografie pe TEAE-celuloză s-au dializat faţă de tampon Tris-HCl 50 mM, pH = 8 pentru îndepărtarea NaCl, apoi s-au concentrat prin per evaporare şi s-au analizat imunoelectroforetic în comparaţie cu extractul iniţial. În figura 9 este redată imunoelectroforegrama fracţiunii I în comparaţie cu extractul iniţial. De remarcat că fracţiunea VI, care conţine majoritatea proteinelor, nu conţine nici o componentă antigenică.

Fracţiunile obţinute prin filtrare în gel au fost puse la dializă faţă de apa distilată timp de 24 ore, apoi supuse analizei imunoelectroforetice.

Fracţiunea lipoproteică, care conţine majoritatea proteinelor s-a dovedit şi de data aceasta a fi neantigenică. De asemenea nici fracţiunea 2 nu a dat linii de precipitare, ceea ce s-ar putea datori denaturării componentelor proteice în urma precipitării în tampon acid acetic acetat la pH=5,5.

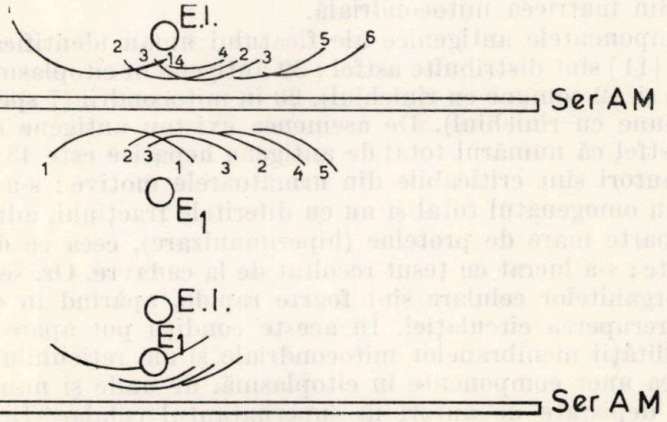


Fig. 8. — Imunoelectroforeza proteinelor mitocondriale separate de la un bolnav cu icter mecanic prelungit în comparaţie cu mitocondriile normale.

E.I. = extractul DOC 0,5% al mitocondriilor de la icteric.
E_1 = extract DOC 0,5% al mitocondriilor din ficat normal.

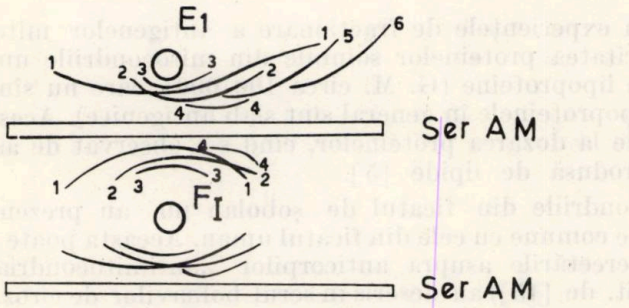


Fig. 9. — Imunoelectroforeza fracţiunilor obţinute prin cromatografie pe TEAE-celuloză.

E_1 = extractul DOC 0,5% solubil.
F_I = fracţiunea I de la cromatografie.

DISCUŢII

În studiile de caracterizare imunochimică a organitelor celulare trebuie să se ţină seama de metoda utilizată pentru extragerea proteinelor din mitocondrii. Proprietăţile imunochimice ale proteinelor solubile variază după metoda de extracţie; poziţia şi forma liniilor de precipitare diferă

în funcție de natura și concentrația detergenților utilizați (Perlmann, cit. de [24]). După cum s-a văzut și în cazul mitocondriilor din ficatul uman au existat diferențe, cel mai eficace dovedindu-se dezoxicolatul de Na, care dealtfel a fost detergentul adecvat și pentru solubilizarea mitocondriilor pentru determinarea activității citocromoxidazei și a unor enzime din matricea mitocondrială.

Componentele antigenice ale ficatului uman identificate de Chordi și colab. [11] sînt distribuite astfel : 32 antigene în citoplasmă (8 specifice, 12 serice și 12 comune cu rinichiul), 20 în mitocondrii (7 specifice, 7 serice și 6 comune cu rinichiul). De asemenea existau antigene comune fracțiunilor, astfel că numărul total de antigene hepatice este 43. Experiențele acestor autori sînt criticabile din următoarele motive : s-a realizat imunizarea cu omogenatul total și nu cu diferitele fracțiuni, administrîndu-se o doză foarte mare de proteine (hiperimunizare), ceea ce duce la reacții încrucișate ; s-a lucrat cu țesut recoltat de la cadavre. Or, se știe că modificările organitelor celulare sînt foarte rapide, apărînd în cîteva minute după întreruperea circulației. În aceste condiții pot apare tulburări ale permeabilității membranelor mitocondriale și ale reticulului endoplasmic și trecerea unor componente în citoplasmă, de unde și numărul mare de antigene depistate de autori în supernatantul celular. În cazul nostru imunizarea s-a făcut cu mitocondrii izolate din țesut prelevat prin biopsie intraoperatorie, care au fost administrate la scurtă vreme după izolare ; antigenul s-a administrat pînă cînd s-a observat că titrul anticorpilor nu mai crește, fără a se face o hiperimunizare, în scopul evitării reacțiilor încrucișate ; la imunizare s-a utilizat fracțiunea mitocondrială în locul omogenatului total, pentru a obține un ser antimitocondrial cît mai specific.

Din experiențele de fracționare a antigenelor mitocondriale reiese că majoritatea proteinelor solubile din mitocondriile umane se află sub formă de lipoproteine (G. M. circa 100 000), care nu sînt antigenice (se știe că lipoproteinele în general sînt slab antigenice). Aceste date concordă cu cele de la dozarea proteinelor, cînd s-a observat de asemenea o turbiditate produsă de lipide [5].

Mitocondriile din ficatul de șobolan nu au prezentat componente antigenice comune cu cele din ficatul uman. Aceasta poate avea importanță pentru cercetările asupra anticorpilor „antimitocondriali". Doniach și colab. (cit. de [15]) au descris în serul bolnavilor de ciroză biliară primară anticorpi ce reacționează cu mitocondriile din diferite organe și de la diferite specii, detectați prin reacția de fixare a complementului și prin imunofluorescență. Berg și colab. [7]—[9] identifică antigenul ca fiind o lipoproteină din membrana internă mitocondrială. Antigenul era foarte sensibil la tratamentul cu enzime proteolitice, fosfolipaze și solvenți ai lipidelor, agenți tensioactivi. Anticorpii „antimitocondriali" au fost detectați în ciroza biliară primară (93 % din cazuri), hepatita cronică activă (24 % din cazuri), obstrucție biliară extrahepatică (5 %), hepatita virală (4 %), precum și în icterele medicamentoase după halotan, clorpromazină [15].

Dat fiind că la testarea anticorpilor antimitocondriali se utilizează mitocondriile de șobolan se pune problema dacă de fapt aceștia sînt anticorpi specifici antimitocondriali sau reprezintă o reacție încrucișată

cu o lipoproteină mitocondrială. Acest punct de vedere este susținut de absența liniilor de precipitare între mitocondriile iepurilor imunizați și serul autolog, ca și de lipsa vreunui efect inhibitor al serului autolog asupra respirației mitocondriilor iepurilor imunizați. Dealtfel, în experiențele efectuate de Berg și colab. în laboratorul lui Chappell, funcțiile mitocondriale (respirația, fosforilarea oxidativă și umflarea-contracția) nu au fost afectate de prezența serului cu anticorpi „antimitocondriali" [10].

Wright și colab. [27] evidențiază în serul bolnavilor de sifilis anticorpi „antimitocondriali", denumiți anticorpi F, care ar fi diferiți de cei din ciroza primară, denumiți anticorpi M. Anticorpii F, evidențiați prin imunofluorescență pe secțiuni renale au ca antigen cardiolipina din mitocondrii, dar sînt fixați și de cardiolipina folosită în reacțiile serologice de diagnostic al sifilisului și sînt diferiți de reaginele care dau reacția Wassermann.

Pe baza datelor de mai sus, aceste reacții atribuite anticorpilor „antimitocondriali" pot fi reacții încrucișate cu componentele mitocondriale, fără rol patogenetic, doar cu importanță diagnostică.

Mulțumiri

Fracționarea mitocondriilor și analizele imunoelectroforetice au fost efectuate în Laboratorul de imunochimie al Institutului de biochimie. Autorul își exprimă recunoștința pentru condițiile de lucru și îndrumarea competentă acordată de dr. doc. Victor Gheție, precum și pentru ajutorul dat în unele experiențe de colectivul laboratorului. De asemenea mulțumește tov. Victoria Pătraș pentru ajutorul dat la prepararea serului antimitocondrial și dr. T. Mureșan pentru permisiunea de a utiliza aparatul de liofilizare.

Prezentat la redacție la 24 ianuarie 1973

Catedra de biochimie
Institutul de medicină și farmacie
Cluj

IMMUNOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF HUMAN LIVER MITOCHONDRIA

SUMMARY

Immunochemical analysis of mitochondria isolated from surgically prelevated samples of human liver tissue has been performed. Mitochondrial antigens solubilized with sodium deoxycholate were fractionated by chromatography on TEAE-cellulose, DEAE-cellulose and gel filtration, on Sephadex G-150. Most mitochondrial proteins were not antigenic. However, immunoelectrophoretic assay emphasized nine mitochondrial

antigenic components. Changes were detected in pathological conditions (prolonged obstructive jaundice). No common antigenic components of human and rat liver mitochondria could be detected. The importance of an immunochemical analysis of human liver mitochondria is discussed taking into account the data about „antimitochondrial antibodies".

BIBLIOGRAFIE

1. Bârzu O., Benga G., Mureşan L., Dancea S., Tilinca R., Enzyme, **12**, 433 (1971).
2. Bârzu O., Mureşan L., Benga G., Anal. Biochem., **46**, 374 (1972).
3. Bârzu O., Mureşan L., Dancea S., Tarmure C., Jebeleanu G., Benga G., Enzyme, **12**, 626 (1971).
4. Benga G., Mureşan L., Hodarnau A., Dancea S., Biochem. Med., **6**, 508 (1972).
5. Benga G., Mureşan L., Dancea S., 7th Meet. Eur. Biochem. Soc., (1971), Abstr., p. 233.
6. Benga G., Tarmure C., Hodarnau A., Enzyme, **12**, 574 (1971).
7. Berg P. A., Doniach D., Roitt I. M., J. exp. Med. **126**, 277 (1967).
8. Berg P. A., Muscatello U., Roitt I. M., Brit. J. exp. Path., **50**, 200 (1969).
9. Berg P. A., Roitt I. M. Doniach P., Horne R. W., Clin. Exp. Immunol., **4**, 511 (1969).
10. Berg P. A., Roitt I. M., Doniach D., Cooper H. M., Immunology, **17**, 281 (1969).
11. Chordi A., Lledias T., Santamaria P., Alvarez-Moreno C., Ortiz de Landazuri E., Path. Europ., **4**, 209 (1969).
12. D'Amelio V., Mutolo V., Barbarino A., Exp. Cell. Res., **29**, 1 (1963).
13. De Duve C., în *Methods in Enzymology*, vol. X, edit. S.P. Collowick, N. O. Kaplan, Academic Press, New York, 1967, p. 7.
14. Dioguardi N., Fiorelli G., Ideo G., în Protides Biol. Fluids, Proc. Colloq., **15**, 335 (1967).
15. Doniach D., Proc. Roy. Soc. Med., **63**, 527 (1970).
16. Doniach D., Delhanty J., Lindqvist H. L., Catterall R. D., Clin. Exp. Immunol., **6**, 871 (1970).
17. Gheţie V., Micuşan V., *Analiza imunochimică. Teorie şi practică*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1966.
18. Hadziyannis S., Scheuer P. J., Feizi T., Naccarato R., Doniach D., Sherlock S., J. Clin. Pathol., **23**, 95 (1970).
19. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A., Randall R. J., J. biol. Chem., **193**, 265 (1951).
20. Lundqvist U., Goeringer G. C., Perlmann P., Exp. Molec. Path., **5**, 427 (1966).
21. Lundqvist U., Perlmann P., Enekull U., Exp. Cell Res., **47**, 363 (1967).
22. Rodriguez M., Paronetto F., Schaffner F., Popper H., J.A.M.A., **208** 148 (1969).
23. Santamaria P., Chordi A., Ortiz de Landazur E., Path. Europ., **2**, 427 (1967).
24. Şelariu C., Rev. roum. Biochim., **2**, 79 (1965).
25. Şelariu C., Rev. roum. Biochim., **2**, 357 (1965).
26. Whittingham S., Irwin J., Mackay I. R., Cowling D. C., Australasian Ann. Med., **18**, 130 (1969).
27. Wright D. J. M., Lessof M. H., Grimble A. S., Doniach D., Turk J. L., Caterall R. D., Lancet, nr. 7650, 740 (1970).

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 3, 261–268 (1973)

ACȚIUNEA CODEINEI ASUPRA ACTIVITĂȚII UNOR ENZIME DIN FICATUL ȘI SERUL DE ȘOBOLAN

V. BOTA, I. V. KOVÁCS și S. ÁDÁM

Rezumat. — S-a determinat activitatea unor enzime din ficatul și serul de șobolan —LDH, GOT, GPT, aldolaza, fosfataza alcalină, colinesteraza — sub influența codeinei administrate în doze terapeutice timp de o lună.
Modificări semnificative se observă în primele 10 zile de tratament, după care activitatea enzimelor studiate tinde să revină la normal.

Codeina este o substanță medicamentoasă frecvent folosită, datorită acțiunii sale inhibitoare asupra centrului tusogen bulbar, cît și datorită acțiunii sale analgezice. După administrare pe cale orală și parenterală, codeina se distribuie în țesuturi. Numeroase studii [1] au arătat că metabolizarea ei la om are loc pe trei căi principale : conjugare cu acidul glucuronic, 0-demetilare la morfină și N-demetilare la norcodeină. Acești produși au fost puși în evidență și în experiențele pe animale [2].

Excreția codeinei are loc prin urină, după 6 ore de la administrare, dar cantități mici pot fi găsite și după cîteva zile. În urină codeina apare 14% sub formă conjugată, 7% ca morfină conjugată, 4% sub formă de norcodeină și 1% ca morfină [3]. La administrarea de doze terapeutice de codeină, cea mai mare parte din substanță apare în urină sub formă conjugată, în timp ce la administrarea de doze ridicate apar și cantități măsurabile de norcodeină și morfină.

Metabolizarea codeinei are loc, în cea mai mare parte, la nivelul ficatului. Acesta poate fi afectat nu numai de dozele toxice, ci și de doze terapeutice de droguri [4]. Numeroase studii au arătat că afectarea ficatului datorită diverselor medicamente duce la creșterea activității unui mare număr din enzimele sale [4] — [13].

Codeina este mai puțin toxică decît morfina, după cum s-a dovedit prin studii toxicologice [2]. Totuși, s-au semnalat multe cazuri de intoxicații cu codeină la copii, a căror sensibilitate mărită s-ar datori activității incomplete a sistemelor enzimatice implicate în metabolizarea acestei substanțe [14].

Datorită inactivării mai lente a codeinei în organismul copiilor, după administrarea unor doze crescute din acest medicament apare mai evident efectul secundar de inhibare a centrului respirator bulbar. Aceste intoxicații cu codeină la copii sînt caracterizate printr-o paralizie a respirației și hipoxie.

Deşi codeina este folosită frecvent, acţiunea ei asupra activităţii enzimatice nu a fost încă studiată. În lucrarea de faţă ne-am propus să urmărim efectul codeinei administrate în doze mici, într-o perioadă mai lungă, asupra următoarelor enzime hepatice şi serice la şobolani : lactat-dehidrogenaza (LDH), glutamat-oxalacetat transaminaza (GOT), glutamat-piruvat transaminaza (GPT), aldolaza, fosfataza alcalină, colinesteraza.

MATERIAL ŞI METODE

S-au efectuat experienţe pe 78 de şobolani masculi, albi, rasa Wistar, în greutate medie de 160 g, împărţiţi în două grupe. Prima grupă a cuprins 48 de animale, împărţite în 6 loturi de cîte 8, cărora le-a fost administrată zilnic, intraperitoneal, o doză de 8 mg/kg corp de codeină, timp de 30 de zile. Grupa a doua a cuprins 30 de animale martor, împărţite în 6 loturi de cîte 5, cărora li s-a administrat zilnic ser fiziologic, într-un volum egal cu soluţia de codeină injectată animalelor de experienţă. Loturile de animale au fost sacrificate pe rînd, prin sîngerare, cu secţionarea venei jugulare, la 4,24, 48 de ore şi 10,20, 30 de zile de la începerea tratamentului. Din ficatul proaspăt izolat s-a preparat un omogenat de 10% în apă distilată, utilizînd un omogenizator cu cuţite, la o turaţie de 8 000 rot/min, timp de 5 minute. În omogenatul obţinut, cît şi în serul sîngelui recoltat s-a determinat activitatea enzimatică prin următoarele metode :

Lactatdehidrogenaza după S. Lindy şi A. Konttinen [15] — [18] prin urmărirea oxidării NADH-ului la 364 nm în U.V.

Glutamat-oxalacetat transaminaza şi glutamat-piruvat transaminaza după Reitman şi Frenkel [19], *colinesteraza* după Hestrin [20], metodă modificată de Huerga, Yesinick şi Popper [21], *aldolaza* după Tovarniţki — Volniskaia [22], *fosfataza alcalină* după Bodansky [23].

Determinările fotometrice au fost efectuate cu un colorimetru fotoelectric tip F.E.K.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele obţinute în funcţie de durata tratamentului sînt arătate în figurile 1,2,3,4,5 şi 6. Aceste grafice reprezintă diferenţa dintre valorile medii ale activităţii enzimatice la animalele tratate, faţă de valorile medii ale activităţii aceloraşi enzime la animalele martor.

Lactatdehidrogenaza

Activitatea LDH din ficatul de şobolan creşte după 4 ore de la administrarea de codeină, se menţine la acelaşi nivel după 24 de ore şi atinge valoarea maximă după 48 de ore de la începerea tratamentului (fig. 1). Din acest moment are loc o scădere mai pronunţată a activităţii, pînă la a 10-a zi de tratament, urmată de o perioadă de stagnare între a 10-a zi a 20-a zi şi apoi de o scădere lentă pînă la normalizarea atinsă la a 30-a zi de la începerea tratamentului.

Prima valoare maximă a activităţii reprezintă la şobolanii trataţi mai mult decît dublul valorii găsite la cei netrataţi, iar a doua valoare maximă a activităţii LDH, observată după 48 ore, este de aproximativ două ori mai mare la şobolanii trataţi cu codeină decît la şobolanii martor.

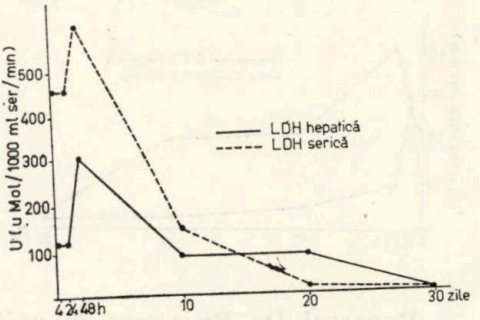


Fig. 1. — Activitatea lactatdehidrogenazei (LDH) hepatice şi serice la şobolani trataţi cu codeină.

Activitatea LDH serice se ridică brusc la 4 ore după prima administrare, menţinîndu-se la acelaşi nivel şi după 24 ore. Peste 48 de ore se observă o creştere pronunţată, urmată de o scădere pînă la a 10-a zi, tinzînd apoi treptat spre valori normale.

Transaminazele

În cazul injectării de codeină la şobolani, GOT hepatică prezintă o activitate maximă la 24 ore după prima administrare, apoi scade mult pînă la a doua zi de tratament, cu tendinţa treptată de normalizare. Maximul activităţii observate după 24 de ore la animalele tratate este aproape dublu faţă de valoarea găsită la animalele martor (fig. 2).

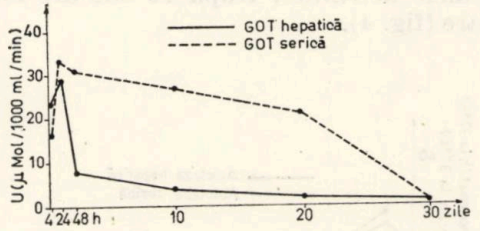


Fig. 2. — Activitatea glutamat-oxalat transaminazei (GOT) hepatice şi serice la şobolani trataţi cu codeină.

GOT serică prezintă cea mai mare valoare tot la 24 ore după prima administrare. Diferenţa maximă se caracterizează prin creşterea cu 60% a activităţii acestei enzime la animalele tratate, faţă de valorile măsurate la animalele netratate. După 48 ore are loc o scădere a activităţii, dar mai lentă, iar normalizarea are loc după a 30-a zi de tratament.

GPT din ficat (fig. 3) prezintă o comportare analoagă cu a GOT, deoarece diferenţa maximă de activitate dintre animalele tratate şi cele netratate se observă tot după 24 ore de la prima administrare de codeină şi întrece cu 30% valoarea normală. După 48 ore GPT hepatică prezintă un nivel mai scăzut al activităţii şi descreşte apoi, în continuare, spre normalizare.

GPT serică ajunge la valoarea maximă numai la 48 de ore la prima administrare, creşterea activităţii reprezentînd aproximativ 90% comparativ cu animalele netratate. După 48 ore are loc o scădere a activităţii, evoluînd lent spre valori normale.

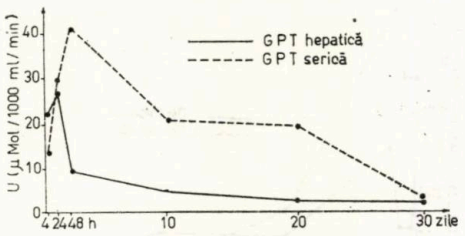


Fig. 3. — Activitatea glutamat-piruvat transaminazei (GTP) hepatice şi serice la şobolani trataţi cu codeină.

Raportul De Ritis este subunitar în ficatul şobolanilor trataţi şi netrataţi. Acest raport are o valoare mai ridicată în primele 10 zile după începerea tratamentului cu codeină, apoi scade, astfel că la 30 de zile nu mai apar diferenţe.

În serul şobolanilor raportul De Ritis este supraunitar şi diferenţa cea mai mare se observă la 48 ore după prima administrare, cînd GPT şi GOT serice înregistrează valorile maxime de activitate.

Aldaloza

La şobolanii trataţi cu codeină aldolaza hepatică atinge valoarea maximă a activităţii la 48 ore după prima administrare. Această valoare maximă corespunde la mai mult decît dublul valorii de activitate măsurate la animalele netratate. După 10 zile are loc scăderea activităţii spre normalizare (fig. 4).

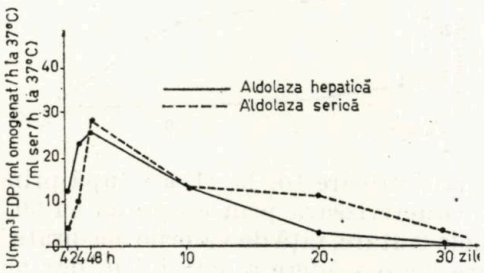


Fig. 4. — Activitatea aldolazei hepatice şi serice la şobolani trataţi cu codeină.

Aldolaza serică prezintă, ca şi cea hepatică, o valoare maximă a activităţii la 48 ore de la prima administrare, urmată apoi de o scădere accentuată pînă la a 10-a zi. Această valoare se menţine în ser pînă la a 20-a zi de la prima administrare, după care scade spre valori normale. Valoarea maximă observată corespunde dublei valori măsurate la animalele martor.

Fosfataza alcalină

Fosfataza alcalină (fig. 5) din ficatul de şobolan prezintă o creştere maximă a activităţii la 48 ore după prima administrare şi apoi o scădere continuă, mergînd spre normalizare. Diferenţa maximă observată la animalele tratate faţă de martori este însă mică.

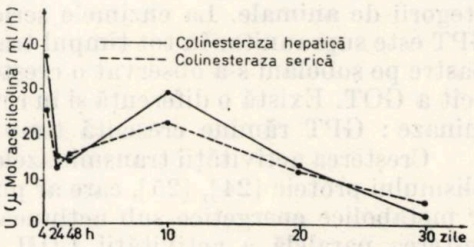


Fig. 5. — Activitatea colinesterazei hepatice şi serice la şobolani trataţi cu codeină.

Fosfataza alcalină din ser, ca şi cea hepatică, prezintă o valoare maximă numai după 48 ore, corespunzînd unei activităţi peste dublul valorii observate la animalele netratate. După 48 ore de la prima administrare are loc o scădere a activităţii, spre normalizare. Diferenţa observată în ser la animalele tratate, faţă de martori, este mai mare decît cea observată la ficat, prezentînd încă şi după 20 zile valori ridicate.

Colinesteraza

La colinesteraza hepatică, curba variaţiei activităţii enzimatice prezintă două valori maxime : la 4 ore şi după 10 zile de la administrarea primei doze de medicamente. Revenirea la normal se observă şi în acest caz (fig.6).

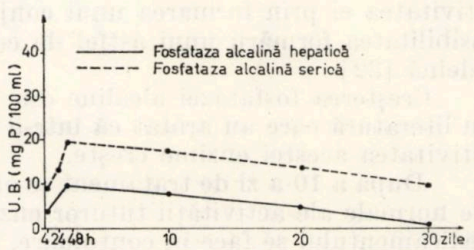


Fig. 6. — Activitatea fosfatazei alcaline hepatice şi serice la şobolani trataţi cu codeină.

În cazul colinesterazei serice, activitatea enzimatică prezintă o valoare maximă după 4 ore de la prima administrare, urmată de o scădere apoi, de un nou maxim, la a 10-a zi de administrare, după care scade spre normalizare. Diferenţele maxime observate în ser după 4 ore şi, respectiv, 10 zile sînt mai scăzute decît cele din ficat.

Pe baza datelor experimentale se poate constata deci următoarea ordine de sensibilitate a enzimelor studiate, la administrarea codeinei în doze mici.

În ficat : Aldolaza > LDH > GOT > GPT > Colinesteraza > Fosfataza alcalină
În ser : LDH >Fosfataza alcalină > GPT > Aldolaza > GOT > Colinesteraza.

În afecțiunile ficatului are o deosebită importanță raportul GOT/GPT. Pentru enzimele hepatice studiate, acest raport este subunitar, atît la animalele netratate, cît și la cele tratate, și crește în timpul tratamentului pînă la a doua zi. După 48 ore valoarea raportului este aceeași la ambele categorii de animale. La enzimele serice s-a constatat că raportul GOT/GPT este supraunitar în tot timpul tratamentului. În cursul experiențelor noastre pe șobolani s-a observat o creștere maximă mai mare a GPT serice decît a GOT. Există o diferență și în revenirea la normal a celor două transaminaze : GPT rămîne crescută timp mai îndelungat.

Creșterea activității transminazelor hepatice indică o afectare a metabolismului proteic [24], [25], care ar putea fi o urmare a reducerii proceselor metabolice energetice sub acțiunea codeinei. Acest fapt contribuie la creșterea paralelă a activității LDH hepatice, fenomen semnalat și de Hauss și colab. [26] în cazul administrării unor excitanți. Celula hepatică ar putea să compenseze, cel puțin parțial, prin activarea reacțiilor de transaminare, o reducere a obținerii de energie, determinată de tulburarea altor căi metabolice. Precum au arătat unii autorii [8], [12], [27] — [29], în cazul afecțiunilor ușoare hepatice, după administrarea anumitor medicamente, are loc creșterea transaminazelor serice, evidențiată prin creșterea mai accentuată a GPT decît a GOT, fenomen observat și în experiențele noastre.

Creșterea activității LDH hepatice și serice, observată de noi, s-ar putea explica prin perturbarea metabolismului energetic sub acțiunea codeinei, ca urmare a unei ușoare stări de hipoxie celulară.

Creșterea activității aldolazei hepatice și serice la animalele tratate ar putea fi corelată cu o afectare a metabolismului glucozei sub acțiunea codeinei sau a produșilor săi de metabolizare [24], [31]. Aldolaza hepatică fiind o proteină cu multe grupe — SH libere, codeina ar putea influența activitatea ei prin formarea unui conjugat peptidic. *In vitro* s-a arătat posibilitatea formării unui astfel de conjugat între glutation, morfină și codeină [32].

Creșterea fosfatazei alcaline din ser este în concordanță cu datele din literatură care au arătat că într-o serie de intoxicații medicamentoase activitatea acestei enzime crește.

După a 10-a zi de tratament se observă tendința de revenire la valorile normale ale activității tuturor enzimelor studiate, deși administrarea medicamentului se face în continuare. Acest fapt pare să fie dovada unei eventuale toleranțe față de codeină, care se instalează la șobolanii tratați. O toleranță accentuată a fost observată și la administrarea repetată de analgezice narcotice, ca morfina și meperidina [33].

CONCLUZII

Din datele experimentale obținute în urma administrării intraperitoneale la șobolani a unei doze zilnice de 8 mg/kg corp de codeină, timp de 30 de zile rezultă că activitatea enzimelor studiate prezintă o modificare

semnificativă la începutul tratamentului, iar după 10 zile se constată o tendinţă spre normalizare.

Prezentat la redacţie la 21 octombrie 1972

Facultatea de farmacie I.M.F.
Disciplina de biochimie
farmaceutică
Tg.-Mureş

THE CODEINE ACTION UPON SOME HEPATIC AND SERUM ENZYMES IN RAT

SUMMARY

Procedures have been carried out to evaluate the activity of some enzymes in rat liver and serum, namely LDH, GOT, GPT, aldolase, alkaline phospatase, choline esterase under the influence of codeine administered for a month in therapeutical doses.

Significant variations have been observed in the first ten days of treatment; subsequently, the activity of the studied enzymes tended to normalize.

BIBLIOGRAFIE

1. E. G. Clarke, *Isolation and Identification of Drugs*, London, The Pharmaceutical Press 268 (1969).
2. T. K. Adler, J. Pharmacol., **140**, 155 (1963).
3. T. K. Adler, J. M. Fujimoto, E. L. Way, E. M. Baker, J. Pharmacol., **114**, 251 (1955).
4. N. Mihăilescu, F. Köppich, S. Klein, V. Străinu, Viaţa medicală, **15**, 685 (1968).
5. I. P. Benhamon, P. Berthelot, R. Fouvert, Rev. Prat. (Paris), **12**, 583, (1962).
6. M. Neumann, La Presse Medicale, **78** 1938 (1970).
7. J. F. Morrissey, R. C. Rubin, Amer. Rev. Resp. Dis., **80**, 855 (1959).
8. J. H. Mason, F. Wroblewski, Arch. Intern. Med., **99**, 245 (1957).
9. J. E. Berk, H. Harris, B. Pringle, Gastroenterology, **39**, 702 (1960).
10. M. Dunn, J. Martins, K. R. Reissmann, J. Lab. clin. Med., **51**, 259 (1958).
11. A. G. Fazekas, I. G. Fazekas, B. Rengei, Canad. J. Biochem., **38**, 899, (1960).
12. I. Janota, C. W. Wincey, M., Sandiford, M. J. Smith, Nature, **185**, 935 (1960).
13. M. Brin, M. Tal, A. S. Ostashever, H. Kalinsky, J. Natur, **71**, 416, (1960).
14. P. Lange, Die Phamazie, **23**, 8 (1968).
15. S. Lindy, A. Konttinen, Clin. chim. Acta, **14**, 615 (1966).
16. S. Lindy, A. Konttinen, Amer. J. Cardiol., **19**, 563 (1967).
17. A. Konttinen, S. Lindy, Clin. chim. Acta, **16**, 377 (1967).
18. A. Konttinen, S. Lindy, Acta med. scand., **181**, 513 (1967).
19. S. Reitman, S. Frenkel, Amer. J. clin. Path., **28**, 56 (1957).
20. S. Hestrin, J. biol. Chem. **18**, 249 (1949).
21. J. de la Huerga, Ch. Yesinick, N. Popper, Amer. J. Clin. Path., **22**, 1126 (1952).
22. G. Tănăsescu, Georgeta Costescu, *Biochimie medicală*, Bucureşti, Edit. didactică şi pedagogică, p. 158 (1966).
23. M. Bodansky, J. biol. Chem. **101**, 93 (1933).

24. H. N. CRISTENSEN, Amer. Rev. Biochem., **22**, 23 (1953).
25. K. S. HENLEY, H. S. WIGGINS, H. M. POLLARD, E. DULLAERT, Gastroenterology, **26**, 1 (1959).
26. W. H. HAUSS, H. J. LEPPELMANN, H. PLANIK, Klin. Wschr., **35**, 957 (1957).
27. F. WROBLEWSKI, J. S. La DUE, Proc. Soc. exp. Biol., **90**, 210 (1955).
28. C. MANSO, A. TARANTA, I. NYDICK, Proc. Soc. exp. Biol., **93**, 84 (1956).
29. A. A. DRIVSHOLM, S. MADSEN, Scand. J. clin. Lab. Invest., **13**, 442 (1961).
30. W. BRECKT, J. KUNKELE, Klin. Wschr., **38**, 936 (1960).
31. W. PATRICK, A. DODGE, E. TAKEMORI, Biochem. Pharmacol., **18**, 1873 (1968).
32. A. L. MISRA, L. A. WOODS, Nature, **19**, 1126 (1970).
33. Z. M. BACQ, *Fundamentals of Biochemical, Pharmacology*, Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris, 1971, p. 600.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 3, 269–277 (1973)

UN NOU SISTEM DE REPREZENTARE A DATELOR REFERITOARE LA METABOLISMUL INTERMEDIAR

I. BRAD

Rezumat. — Se prezintă un proiect al unui sistem de reprezentare a rezultatelor obținute în cercetările de biochimie prin expunerea cantitativă în unități standardizate a conținutului de substrate și activitatea enzimelor, folosindu-se ca schelet schema „căilor metabolice" a lui Nicholson.

Se dau ca exemple particulare schimburile metabolice comparativ la plantele rezistente și nerezistente la ger în timpul iernii, care dau o imagine sintetică a diferențierii între rezistent și nerezistent. Metabolismul fiind un proces cu „n" dimensiuni variabile, acest procedeu expus apare ca un sistem de sinteză de perspectivă, pentru centralizarea cercetărilor de biochimie și dezvoltarea în perspectivă a acestora.

Cercetările efectuate de-a lungul timpului au dus la descoperirea majorității proceselor de transformare, de sinteză și de degradare a substanțelor care fac parte din complexul biochimic celular.

Pornindu-se de la descoperirea transformărilor pe care le suferă un metabolit sub influența uneia sau a mai multor enzime, s-a ajuns la descoperirea lanțurilor metabolice, a căilor metabolismului intermediar și a proceselor ciclice.

Nicholson a expus sintetic rezultatele obținute de-a lungul vremii la diverse tipuri de organisme, în schema căilor metabolice, corespunzătoare cazului celui mai general [3].

Se înțelege de la sine că nu toate lanțurile de transformare metabolică sau toate ciclurile se întîlnesc la toate viețuitoarele și indiferent de specie, gen, familie, ordin, clasă, încrengătură sau regn. Vitaminele sau aminoacizii esențiali nu sînt sintetizați de multe organisme, dintre care și organismul uman. Prin aceasta se înțelege că lipsește întregul lanț sau secvențele necesare pentru realizarea sintezei lanțului, oprindu-se la nivelul unor precursori.

Continuînd raționamentul se deduce că pentru metabolismul intermediar al unei plante dintr-o specie sau chiar dintr-un soi față de altă plantă dintr-o altă specie sau dintr-un alt soi, aspectul metabolismului intermediar prezentat sub formă de schemă ar implica absența unor lanțuri metabolice sau a unor secvențe din lanț, sau ar implica proporții diferite ale diverselor substanțe simple sau complexe, intensități diferite ale proceselor de transformare, particularități structurale ale substanței și în consecință particularități morfologice și funcționale.

Dacă rezultatele referitoare la metabolismul intermediar al unui organism sau al unui organ sănătos sau bolnav, tînăr sau bătrîn, în condiţii normale sau impuse, ar fi cantitativate pe schema căilor metabolice, exprimate în milimoli sau miligrame (unui milimol sau miligram corespunzîndu-i o anumită unitate de suprafaţă), iar intensitatea activităţii enzimatice ar fi exprimată de exemplu prin una sau mai multe linii, cu indicarea sensului predominant (o linie corespunzînd unui miliechivalent de substrat transformat într-o unitate oarecare de timp), atunci s-ar obţine un număr foarte mare de scheme care ar corespunde profilelor imaginilor particulare ale proceselor metabolice ale cazurilor analizate.

Acest sistem de reprezentare credem că ar aduce o contribuţie la dezvoltarea biochimiei metabolice comparate şi ar permite o înţelegere completă şi complexă a diferenţelor care există între diferite organe şi de asemenea ar favoriza formularea unor ipoteze de lucru, atunci cînd lipsesc datele referitoare la secvenţele metabolice legate de un anumit proces biochimic analizat incomplet. Sistemul acesta de reprezentare permite identificarea zonelor din metabolism asupra cărora nu s-au făcut cercetări în raport cu un subiect dat.

Pentru a ilustra cele discutate mai sus, prezentăm două scheme luînd ca schelet „căile metabolice" după Nicholson şi care reprezintă studiul comparativ al proceselor de acumulare şi transformare a substanţelor în metabolismul intermediar al plantelor cu rezistenţă mică şi cu rezistenţă mare la ger [2] [3].

Făcînd abstracţie de faptul că unele dintre informaţii sînt depăşite, precum şi de faptul că în unele cazuri sînt prezentate valori ipotetice, schema rămîne însă ca un proiect de prezentare a rezultatelor.

Aceste scheme nu sînt executate la scara propusă ca unui milimol de substrat acumulat să-i corespundă o anumită unitate de suprafaţă. Aici sînt sintetizate rezultatele asupra mecanismului biochimic de adaptare şi de supravieţuire al plantelor, sinteză care constituie o parte integrantă a concepţiei noastre asupra rezistenţei [2], [3].

Prin numărul de linii, este reprezentată comparativ intensitatea proceselor de transformare a substanţelor pe diferite căi metabolice. Un număr mai mare de linii semnifică o mai mare intensitate a proceselor în lanţul metabolic corespunzător. Prin cercuri este reprezentat comparativ gradul de acumulare a unor substanţe sau activitatea unor enzime sau valoarea unor indici. Un cerc mai mare are semnificaţia unei activităţi enzimatice mai mari sau a unei valori mai mari a unui coeficient sau raport. Delimitarea unor sectoare de cercuri cu suprafeţe diferite semnifică diferenţe între substanţele din aceeaşi familie, fie din punctul de vedere al gradului de combinare cu protidele, fie din punctul de vedere al proporţiei unora dintre aceşti compuşi.

Determinările referitoare la conţinutul de glucide au arătat că aceste substanţe la plantele mai rezistente se găsesc în cantitate mai mare, fie că este vorba de polizaharide ca celuloza, hemiceluloza sau amidonul, fie că este vorba de glucide mai simple. Deşi aceste substanţe se transformă în timpul iernii în bună măsură în mono-, bi-, sau trizaharide, ele rămîn totuşi în cantitate mai mare la plantele mai rezistente (fig. 1, 2 cerc. 1). Există probabilitatea ca şi glucoproteidele şi mucopolizaharidele să se găsească în cantitate mai mare la aceleaşi plante (fig. 1, 2—2a).

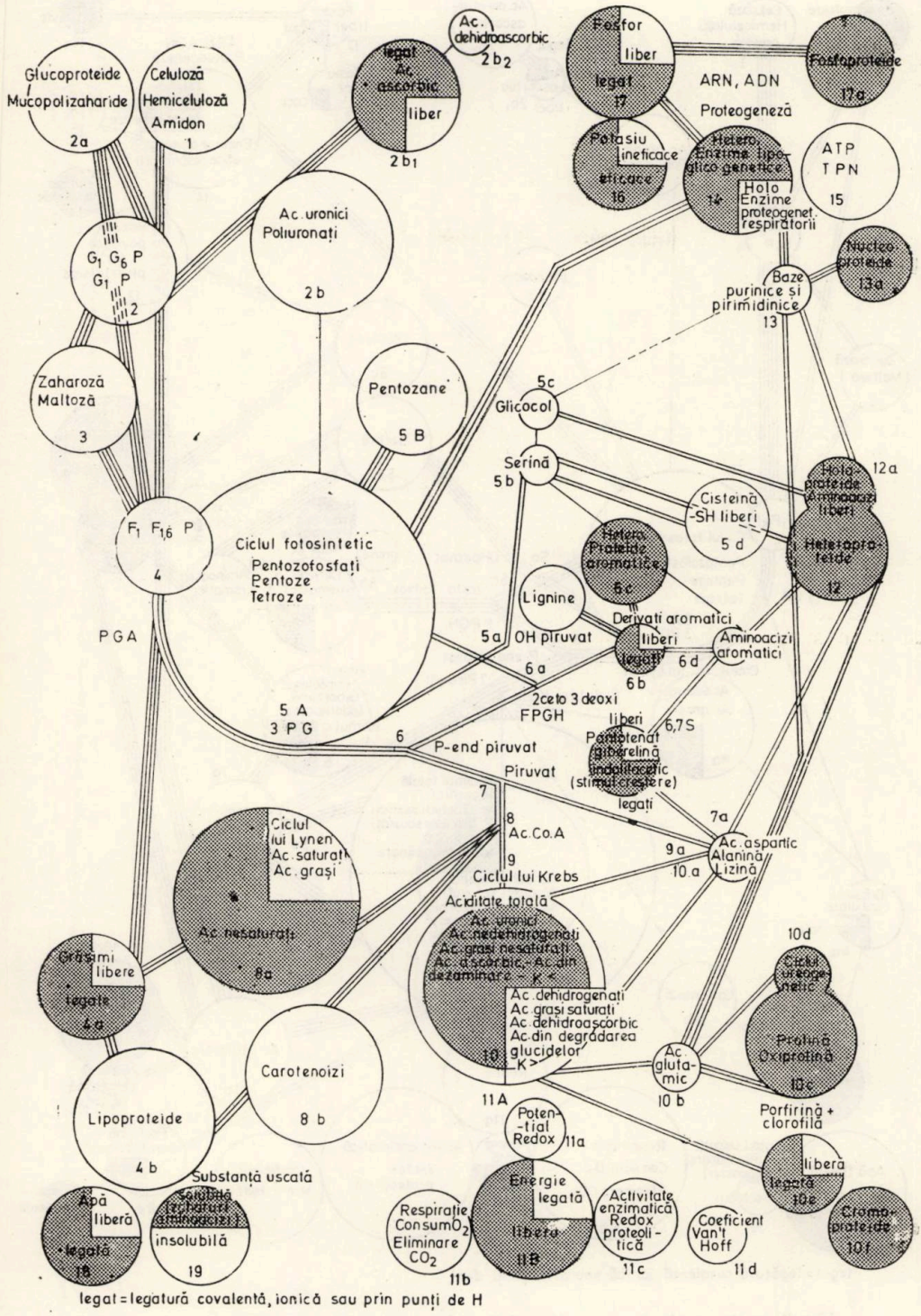


Fig. 1. — Procesele de acumulare și transformare a substanțelor în metabolismul intermediar al plantelor cu rezistență mare la ger.

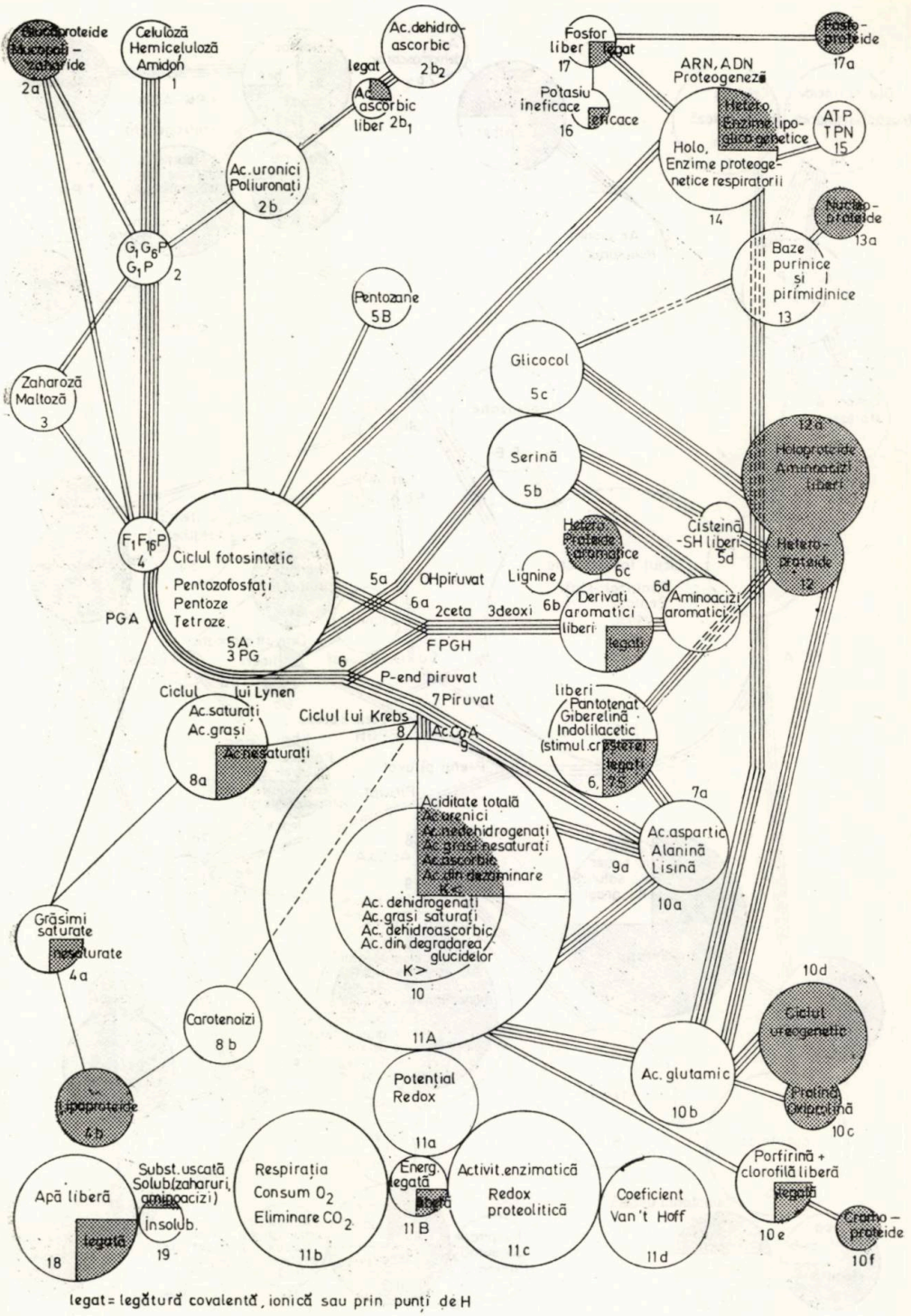


Fig. 2. — Procesele de acumulare și transformare a substanțelor în metabolismul intermediar, al plantelor cu rezistență mică la ger.

În ceea ce privește glucidele simple, la plantele mai rezistente acestea se găsesc în cantități mult mai mari decît la plantele mai nerezistente. Și între acestea există o diferențiere în sensul că zaharoza are o acțiune protectoare mai puternică și în același timp se găsește într-o cantitate și proporție mai mare la plantele cu rezistență naturală mare (fig. 1, 2—3).

Conținutul de acid ascorbic (2b1—2b2) — biocatalizator neenzimatic, cu rol multiplu în metabolismul intermediar, se găsește într-o cantitate mai mare la plantele mai rezistente. La aceleași plante mai rezistente, din cauza stării de latență mai profundă, procesele oxidative sînt mai lente și acidul dehidroascorbic se găsește într-o cantitate mai mică. În mod logic și conform cu unele cercetări, raportul acid ascorbic/acid dehidroascorbic este mai mare la plantele mai rezistente. Acest raport poate corecta unele abateri de la corelația strictă între rezistențe la ger și conținutul de acid ascorbic. Deoarece sinteza acidului ascorbic este rezultatul proceselor ce se desfășoară în ciclul acizilor uronici (2b), este de așteptat ca și conținutul în acești acizi să fie mai mare la plantele mai rezistente, ca și polimerii acestora—poliuronații—substanțe cu acțiune probabil protectoare și care influențează mult viscozitatea protoplasmei.

Transformarea zaharurilor prin glicoliză este foarte probabil mai puțin intensă la plantele mai rezistente. Aceasta se poate deduce și din prezența unei cantități mai mari de hexoze, acumulare care se poate datori și faptului că nu se degradează în ciclul glicolitic. De asemenea conținutul mai mare de glucide se datorește și activității mai mari a ciclului fotosintetic (5A), care implică și acumularea de cantități mai mari de pentoze (5B), tetroze, heptoze, pentozane și alte substanțe înrudite direct.

La plantele mai rezistente, chiar în timpul scăderilor de temperatură, conținutul de lipide este mai mare. Aceasta semnifică faptul că la plantele mai rezistente sînt mai intense procesele pe calea metabolică care duce la sinteza acizilor grași (ciclul lui Lynen) (fig. 1—8a). Cantitățile mici de monozaharide care sînt antrenate în glicoliză se regăsesc la plantele mai rezistente sub formă de glicerină și acizi grași combinați, carotenoizi și produși intermediari (4a, 4b, 8b). Ca o particularitate, la plantele mai rezistente (din zonele mai răcoroase) există tendința acumulării de lipide nesaturate. Cel mai probabil la acestea se formează și o cantitate mai mare de lipoproteide, care datorită particularităților structurale și particularităților lor chimice, determină modificări ale structurii intracelulare.

La plantele mai puțin rezistente, o cantitate mai mare de zaharuri sînt degradate pe cale glicolitică și antrenate în ciclul respirator al lui Krebs, care este mai intens la plantele mai nerezistente (fig. 2—11A). Acest fenomen este trădat prin respirația mai mare care explică în parte și conținutul mai mic de zaharuri, datorită consumării lor. La plantele mai puțin rezistente, o parte din substanțe se transformă mai intens pe calea sintezei substanțelor ciclice (fig. 3—6b, 6c, 6d), rezultînd inclusiv aminoacizi aromatici, triptofan și acid beta-indolilacetic (6, 7S). Tot din aceste substanțe din lanțul glicolitic rezultă o cantitate mai mare de aminoacizi ca : serina, glicocolul. Este adevărat însă, că acumularea lor se poate datori și unei proteolize mai puternice care ar predomina la plantele mai rezistente. La acestea, din produșii ciclici care au ca precursor comun

acidul arabinoheptulosonic-7-fosfat, rezultă produşi de polimerizare ca lignina sau se combină cu proteinele, dînd heteroproteide de tip aromatic (fig. 1—12). Deoarece multe dintre substanţele ce rezultă pe această cale sînt stimulatori sau inhibitori ai proceselor metabolice, se poate afirma că la plantele mai rezistente, substanţele stimulatoare nu se sintetizează sau sînt combinate. Determinarea structurii acestor substanţe ar putea duce la descoperirea unor clase de substanţe cu efect fiziologic puternic. De asemenea, se impune analiza acestor produşi existînd probabilitatea de a se găsi o corelaţie strînsă între prezenţa în cantitate mai mare a unora şi rezistenţa la ger.

Determinarea consumului de oxigen şi a eliminării de bioxid de carbon şi determinarea activităţii dehidrogenazelor *in vivo* duc la concluzia că procesele respiratorii sînt mai puţin intense la plantele mai rezistente după scăderea temperaturii (11a, 11b).

Determinările referitoare la activitatea catalazei şi peroxidazei au dus la concluzia convergentă că la plantele mai rezistente activitatea acestora este mai mare după scăderi puternice de temperatură şi mai mică în perioada temperaturilor scăzute, neletale. Între aceste enzime există însă raport invers, activitatea peroxidazică crescînd iarna. Enzimele au coeficientul Van't Hoff mai mic, în cazul unei rezistenţe la ger, micşorarea acestuia, realizîndu-se dinspre toamnă înspre iarnă mult mai repede (11c—11d). Ca o consecinţă a acestor procese respiratorii, diferenţiate, la plantele mai rezistente predomină acizii nedehidrogenaţi, substanţele cu potenţial redox mai scăzut şi energia liberă este mai mare (11B).

La plantele mai rezistente din acidul cetoglutaric, o cantitate mai mare se transformă pe cale metabolică, care duce la sinteza unor aminoacizi ca prolina şi oxiprolina sau a altor substanţe ca porfirinele şi clorofila (10b, 10c, 10e). La plantele mai rezistente se găseşte în cantitate mai mare clorofila combinată în complexul cromoproteidic clorofilă-proteină.

Din cetoacizii sintetizaţi în ciclul lui Krebs, se sintetizează o cantitate mai mare de alţi aminoacizi şi proteinele sînt hidrolizate în proporţie mai mare la plantele mai puţin rezistente.

Totalitatea cercetărilor duc la concluzia că există tendinţa unei acumulări mai mari de proteină brută la plantele mai puţin rezistente. Din totalul proteidelor ar predomina holoproteidele la plantele mai puţin rezistente şi heteroproteidele la plantele mai rezistente (12, 12 a). Rezistenţa la denaturare, creşterea viscozităţii, modificarea structurii în vederea supravieţuirii, scăderea puternică a proceselor metabolice sînt, foarte probabil, şi efectele heteroproteidizării.

La plantele mai rezistente se acumulează chiar şi nucleoproteide într-o cantitate mai mare (13 a). Analiza conţinutului de substanţe minerale ne arată că la plantele mai rezistente există o cantitate mai mare de fosfor sau potasiu. Este demn de semnalat fenomenul de demineralizare în timpul iernii, care este mai mare în ceea ce priveşte demineralizarea totală, mai mic în ceea ce priveşte demineralizarea potasică şi mult mai mic în ceea ce priveşte demineralizarea fosforică la plantele rezistente. Diferenţele mici însă în ceea ce priveşte conţinutul acestor substanţe la plantele rezistente şi nerezistente sugerează ideea că trebuie analizate substanţele în formula cărora intră fosforul sau potasiul şi distribuirea lor în celulă.

Conținutul mai mare de glucide, asociat cu o respirație mai scăzută cu o fotosinteză mai intensă, conduce la concluzia că la plantele mai rezistente se găsesc în cantitate mai mare combinații organo-fosforice macroergice (15, 16, 17, 17 a). La plantele mai rezistente și conținutul de fosfoproteide este mai mare și probabil și de fosfolipide.

Prin scăderea temperaturii se induce creșterea conținutului de substanță uscată în plantă, ceea ce dovedește că s-au desfășurat procese de modificare și a permeabilității membranei și a structurii protoplasmatice. O parte din macromoleculele membranei au fost transformate în substanțe mai simple, iar în interiorul celulei, substanțele macromoleculare sau simple cu efect protector s-au acumulat în jurul formațiilor celulare, răspunzătoare de procesele de fotosinteză, de procesele energetice și regenerative din celulă. De aceea o cantitate foarte mare de apă este cedată ușor, iar o cantitate mică puternic reținută.

Prin transformarea în heteroproteide, sau alte modificări, proteinele se diferențiază foarte bine, realizîndu-se redistribuirea și aranjarea lor foarte bună, delimitată în celulă.

Teoria transformării din sol în gel a lui Tumanov și teoria grupărilor disulfidice a lui Levitt apar ca o consecință a deplasării metabolismului în sensul descris de noi, care determină acumularea diferitelor substanțe într-o altă proporție la plantele mai rezistente față de cele nerezistente și la acumularea lor în proporțiile prezentate anterior. Acestea au drept consecință realizarea structurii favorabile rezistenței și care include mărirea viscozității și a conținutului de grupări — SH (5d). Această nouă structură afectează la rîndul ei metabolismul.

Deoarece în mod implicit toate aceste transformări includ un control genetic, este de așteptat ca la plantele mai rezistente să predomine acei acizi nucleici care sînt codificați pentru sinteza proteinelor cu activitate enzimatică ce determină în ultimă instanță metabolismul diferențiat. Astfel, la plantele mai rezistente la ger trebuie să predomine acizii nucleici, care favorizează sinteza proteinelor cu activitate enzimatică glicogenetică, lipogenetică, care determină sinteza într-o proporție mai mare a heteroproteidelor și care au un coeficient Van't Hoff mai scăzut (11 d).

Procedînd în mod similar cu toate rezultatele obținute pînă acum în legătură cu conținutul în diferite substanțe și activitățile diferitelor enzime, se pot realiza imaginile globale ale metabolismelor intermediare la nivelul cercetărilor la zi. În acest mod, pe lîngă o foarte ușoară comparație a proceselor biochimice intermediare între un organ sănătos sau bolnav, între două organe ale aceluiași organism, între același organ la soiuri sau specii diferite etc., se vor putea surprinde și secvențele lanțului din metabolism, care nu au fost încă cercetate. Se vor putea face extrapolări, interpolări, ipoteze asupra aspectelor încă neanalizate, se vor putea surprinde punctele în care trebuie să se intervină și sensul în care trebuie dirijat procesul pentru a obține un efect dorit.

În cazul reprezentării diferențiate a metabolismului corespunzător frunzei față de rădăcină sau un alt organ, în sistemul propus ciclul fotosintetic va apare ca factor esențial de diferențiere. În frunze intensitatea proceselor enzimatice din ciclul fotosintetic este puternică, ca și cantitatea de produși primari ai fotosintezei, iar calea metabolică,care duce la sinteza clorofilei și a produșilor intermediari, va fi puternic reprezentată.

Bineînțeles că mai există și alte diferențieri, dar nu insistăm asupra acestora. În cazul în care reprezentăm la nivelul ciclului lui Krebs metabolismul din creier față de cel din tegument, ținînd seama de consumul enorm al oxigenului, intensitatea proceselor enzimatice va fi trasată prin 3—4 linii, iar conținutul de acizi va fi reprezentat prin cercuri corespunzătoare. La tegument intensitatea activității enzimatice din ciclul lui Krebs va fi reprezentată printr-o singură linie și un alt diametru al cercurilor corespunzătoare acizilor. Bineînțeles că în acest caz cantitatea de acid glutamic și activitatea transaminazelor va fi mai mare și în același timp vor fi mai bine reprezentate ca intensitate și cantitate, enzimele și substratele din calea metabolică a sintezei lecitinelor, cefalinelor, cerebrozidelor și altor substanțe ce se găsesc mai ales în țesutul nervos. La tegument în schimb, vor fi mai bine reprezentate căile metabolice care duc la sinteza aminoazaharurilor, a cheratinelor etc.

Revenind la metabolismul plantelor și folosind schemele metabolice prezentate pentru rezistența la ger, azotatul de amoniu determină un tip de metabolism asemănător cu tipul de metabolism corespunzător plantei mai puțin rezistente, iar superfosfatul și sarea potasică determină un tip de metabolism asemănător plantei cu rezistență mai mare la ger.

Procedînd în acest fel s-ar putea realiza imagini sinoptice integrale care ar corespunde imaginilor după care s-ar putea recunoaște și individualiza metabolismul celular corespunzător diferitelor particularități mai sus enunțate.

Se înțelege că se poate face alăturat un tablou al procesului biofizic, care include jocul energetic, schimbul de ioni, circulația substanțelor, ca și un tablou biostructural în care să se vadă modificările de biostructură în raport cu tabloul biochimic și biofizic. În acest fel am avea reprezentat și biochimismul și morfologia indusă de acest biochimism și influența structurii morfologice asupra biochimismului.

Consider că acest sistem de reprezentare cu capacitatea de sinteză și de analiză pînă la detaliu, ar permite o mai ușoară înțelegere, explicare și modificare dirijată a proceselor. Pentru realizarea acestor scheme va fi necesară analizarea cu ajutorul mașinilor electronice a întregului material informativ referitor la biochimismul intermediar. S-ar economisi astfel mult timp, deoarece nu s-ar mai repeta experiențele referitoare la procesele cunoscute și astfel, prin ținerea la curent cu ajutorul acestor scheme cu noutățile referitoare la un proces, s-ar urmări acele fenomene încă neanalizate, acele lanțuri metabolice neexplorate, umplînd golul imens existent în studierea biochimismului intermediar la numeroase procese vitale. În stadiul actual s-ar putea vorbi în unele cazuri de desfășurarea cercetărilor după un sistem nesistematic al „petelor de cerneală". De asemenea în spiritul acestui sistem de reprezentare, apare ca lipsită de sens analiza de exemplu a aminoacizilor, pentru că au aceeași grupare aminică și pentru că se pun în evidență cu aceiași reactivi. Acest sistem de reprezentare ar obliga determinările ca și expunerile rezultatelor după principiul substrat-enzimă-substrat-enzimă, de-a lungul unui lanț, indiferent de gruparea funcțională a substanțelor rezultate, urmînd ca nu numai enzimele ci și substraturile să fie exprimate printr-un cod internațional. De asemenea ar fi necesară standardizarea „unitate de substrat" sau „unitate de activitate enzimatică" pentru *in vivo* sau *in vitro*.

Ţinînd seama de faptul că informaţiile referitoare la biochimismul anumitor procese s-au înmulţit enorm, iar capacitatea intelectuală uneori este depăşită în cazul proceselor cu „n" dimensiuni variabile, cînd „n" este mai mare decît 4, acest sistem apare ca unul dintre procesele de sinteză de perspectivă *.

Prezentat la redacţie la 10 martie 1971

Universitatea Craiova
Facultatea de chimie
Disciplina de biochimie

A NEW SYSTEM OF PRESENTATION THE DATA CONCERNING THE INTERMEDIARY METABOLISM

SUMMARY

The project of a new system for presenting the results of the researches carried out in the field of biochemistry is presented. The system involves a quantitative estimation of different components as well as of the enzymatic activity which are expressed in standardized units, using as a skeleton the metabolic pathways of Nicholson.

Particular examples concerning the metabolic exchanges are comparatively presented in plants exhibiting, or not, winter hardness; a differentiation between resistant and sensitive plants is possible on the basis of these examples. As the metabolism represents a process characterized by "n" variable dimensions, our system may be considered as possessing a prospective value in the field of centralization and development of researches in biochemistry.

BIBLIOGRAFIE

1. Brad I., *Contribuţii la studiul biochimiei rezistenţei la ger a cerealelor de toamnă.* Teză de doctorat, Bucureşti (1968).
2. Brad I., Anal. Inst. cerc. cer. pl. teh., Fundulea, seria C, **XXXV**, 151 (1969).
3. Nicholson D. E., *Metabolic pathways*, Edit. Koch-Light Laboratories LTD, Colnbrook,Bucks, Anglia (1957).

* Comercializarea acestui sistem este interzisă fără aprobarea autorului.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 3, 279–286 (1973)

IZOENZIMELE ŞI CINETICA GLUTAMAT-OXALACETAT AMINOTRANSFERAZEI (E.C.2.6.1.1.) DIN SPERMA DE TAUR

L. M. BURUIANĂ

Rezumat. — Se determină valoarea constantelor Michaelis (K_{mA} şi $K_{m\,\alpha C}$) ale glutamat-oxalacetat aminotransferazei (E.C.2.6.1.1.) din plasma seminală şi spermatozoizii de taur la pH = 7,4 şi 5,5. Modificarea acestor constante, în urma scăderii pH-lui de la 7,4 la 5,5, este mai mare în cazul GOT din plasma seminală decît în cazul spermatozoizilor.

Forma curbelor: activitate/concentraţia substratului devine sigmoidală la pH = = 5,5, spre deosebire de cea hiperbolică de la pH = 7,4. Aceasta dovedeşte că ionii de hidrogen pot provoca modificări conformaţionale deosebite la transaminazele de origini diferite.

Glutamat-oxalacetat transaminaza (GOT) din plasma seminală de taur este o enzimă polimorfică. Prin gel-filtrare pe Sephadex G-100 s-a reuşit să se separe în majoritatea cazurilor 4 izoenzime.

Activitatea acestora scade cu creşterea concentraţiei în ioni de hidrogen. Izoenzima III este total inactivată la pH = 5,5.

Particularităţile aminotransferazelor sau transaminazelor fac obiectul a numeroase cercetări, deoarece aceste enzime realizează legătura dintre diferitele tipuri de metabolism ale celor 3 categorii de compuşi ai materiei vii. Citäm doar cîteva dintre acelea care au contingenţă cu lucrarea de faţă, fie că au servit la confruntarea cu rezultatele obţinute în cazul spermei, fie că au constituit o sursă de inspiraţie pentru alegerea tehnicilor de lucru folosite. Acestea sînt: Buruiană şi Suţeanu [1], Magee şi Phillips [2], Nisselbaum şi Bodansky [3], Şelaru [4], [5].

În ceea ce priveşte cercetările asupra transaminazelor din spermă, numărul lor este redus. Primul care semnalează prezenţa transaminazei (GOT) din sperma de taur este Flipse [6] în 1960. În 1964, Buruiană şi Hadarag [7] stabilesc limitele de variaţie ale activităţii GOT din sperma de taur şi de berbec, corelînd-o cu fecunditatea donatorilor utilizaţi în practica însămînţărilor artificiale. Faptul este confirmat ulterior şi de Gluhovschi şi colab. [8]. Constatarea ar putea fi explicată prin ipoteza că această enzimă participă la sinteza ceto-acizilor, sursă importantă de energie pentru viabilitatea şi mobilitatea spermatozoizilor, via ciclul Krebs.

Deoarece calitatea enzimelor contribuie la reglementarea intensităţii reacţiilor pe care le catalizează, am considerat că este util a cunoaşte

mai complet particularităţile GOT din spermă. În acest scop s-au determinat unii parametri cinetici şi polimorfismul acestei enzime.

MATERIAL ŞI METODE

S-a lucrat cu sperma taurilor utilizaţi ca donatori la Centrul de însămînţări artificiale Săftica. Animalele erau din rasa Holstein, avînd vîrsta între 2 şi 8 ani, sănătoşi din punct de vedere clinic, tabloul morfofiziologic al spermatozoizilor fiind normal în toate cazurile. S-au determinat activitatea GOT, constantele Michaelis K_{mA} şi $K_{m\alpha C}$ la pH = 7,4 şi 5, 5, variaţia activităţii cu concentraţia celor 2 substraturi şi spectrul izoenzimatic.

În cazul spermatozoizilor, aceştia se lizau şi apoi se omogenizau în apă distilată în proporţie de 1 : 6, lăsîndu-se 24 ore la 8°C pentru eventuala manifestare a activităţii transaminazice latente, după care se centrifugau puternic pentru îndepărtarea membranelor.

Activitatea transaminazică s-a apreciat cu metoda Reitman şi Frankel [9], exprimîndu-se activitatea în micrograme de acid piruvic la 1 ml lichid sau pe 1 mg proteină. Aceasta se determina cu tehnica lui Miller [10]. Detalii complete asupra modului de lucru se găsesc în lucrarea citată anterior [1].

Constantele Michaelis pentru cele două substraturi (LD-aspartat şi α-ceto-glutarat) s-au calculat grafic prin metoda lui Lineweaver şi Burk la pH = 7,4 şi 5,5 (în tampon fosfaţi 0,1 M).

Separarea izoenzimelor s-a realizat cu ajutorul cromatografiei pe coloană. În acest scop s-a utilizat Sephadex G-100, care a dat cele mai bune rezultate în cazul spermei. Coloanele utilizate aveau dimensiunile 2 × 28 cm şi se echilibrau cu soluţia tampon TRIS 0,05 M + 0,1 M NaCl pH = 7,4. Se treceau apoi 8 ml de plasmă seminală diluată 1 : 1 cu soluţia tampon TRIS de mai sus. După filtrare se elua în gradient de concentraţie constantă cu acelaşi tampon, prinzîndu-se 24 de fracţiuni a cîte 4 ml. În fiecare se determina activitatea transaminazică şi conţinutul în proteină. Activitatea GOT s-a măsurat la cele două pH-uri menţionate mai sus, deoarece Fleisher, Potter şi Wakim [11] au arătat că pentru aceste două valori ea se modifică diferit cu originea celulară din mitocondrii sau citoplasmă. Comportarea diferită se explică prin structura primară deosebită a proteinei enzimatice a celor două transaminaze. Din punct de vedere electroforetic, cea mitocondrială are o migrare catodică, după cum au arătat Schmidt, Schmidt şi Wildhurt [12], ceea ce sugerează că în compoziţia ei domină aminoacizii cu caracter bazic. Ea nu este afectată de creşterea concentraţiei în ioni de hidrogen, ceea ce pledează pentru existenţa unui centru activ format din aminoacizi acizi sau neutri.

Transaminaza de origine citoplasmatică migrează spre anod, fiind puternic inhibată de sporirea concentraţiei în ioni de hidrogen de la pH = = 7,4 la 5,5 (*loc. cit.* [11]), ceea ce, în conformitate cu raţionamentul aplicat mai sus pentru transaminaza catodică, sugerează o altă structură a centrului activ. De aceea s-a determinat efectul celor două concentraţii de ioni hidrogen atît asupra activităţii transaminazice, cît şi a constantelor Michaelis.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În figurile 1 şi 2 este reprezentată cinetica GOT din plasma seminală şi spermatozoizi la pH = 7,4 şi 5,5, pentru concentraţiile variabile (între $0{,}685.10^{-3}$) şi $3{,}425.10^{-3}$ M) de α ceto-glutarat, concentraţia LD-aspartatului fiind constantă ($20{,}00.10^{-2}$ M). Cinetica s-a determinat pe cel puţin 5 cazuri diferite, provenind de la animale de aceeaşi rasă. În figuri este redat numai rezultatul dintr-un singur caz, valorile constantelor fiind foarte apropiate pentru indivizii cu caractere morfofiziologice şi biochimice ale spermei, asemănătoare.

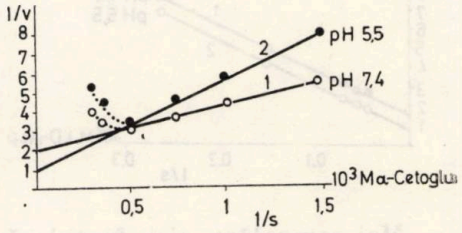


Fig. 1. — Cinetica GOT din plasma seminală de taur la diferite pH-uri (1) pH = 7,4 ; (2) pH = 5,5. Cazul concentraţiei variabile de αceto-glutarat.

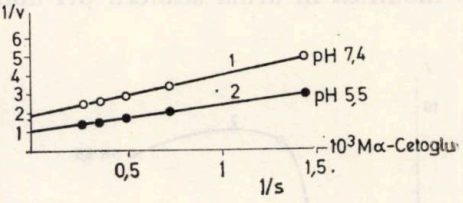


Fig. 2. — Cinetica GOT din spermatozoizii de taur la diferite pH-uri (1) pH = 7,4 ; (2) pH = 5,5 Cazul concentraţiei variabile de α ceto-glutarat.

Se remarcă influenţa inhibitoare a α ceto-glutaratului în cazul plasmei seminale (porţiunea punctată a dreptelor din cazul figurii 1). În figurile 3 şi 4 se reprezintă cinetica GOT din plasma seminală şi spermatozoizi la cele două valori ale pH-ului pentru concentraţii variabile de DL-aspartat (între $3{,}75.10^{-2}$ M la $22{,}50.10^{-2}$ M) şi pentru concentraţia constantă de α ceto-glutarat ($0{,}685.10^{-3}$ M).

Tabela 1 permite comparaţia diferitelor constante Michaelis obţinute:

Tabela 1

Valorile constantelor Michaelis din plasma seminală şi spermatozoizi pentru pH = 7,4 şi 5,5

Constanta Michaelis	Plasma seminală		Spermatozoizi	
	pH = 7,4	pH = 5,5	pH = 7,4	pH = 5,5
K_{mA}	$0{,}345.10^{-1}$ M	$2{,}17.10^{-1}$ M	$1{,}56.10^{-1}$ M	$2{,}22.10^{-1}$ M
$K_{m\alpha C}$	$1{,}31.10^{-3}$ M	$4{,}54.10^{-3}$ M	$1{,}17.10^{-3}$ M	$1{,}33.10^{-3}$ M

Din tabela 1 se remarcă faptul că, în cazul creşterii concentraţiei în ioni de hidrogen, afinitatea GOT pentru LD-aspartat şi α ceto-glutarat scade mult mai mult în cazul plasmei seminale decît al spermatozoizilor. Afinitatea enzimei pentru cele două substraturi, $1/K_{mA}$ şi $1/K_{m\alpha C}$, este de

circa 100 de ori mai mare în cazul α ceto-glutaratului decît al LD-aspartatului, atît pentru plasma seminală, cît şi pentru spermatozoizi.

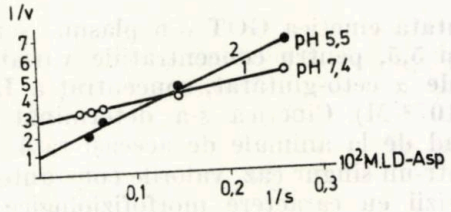


Fig. 3. — Cinetica GOT din plasma seminală de taur la diferite pH-uri (1) pH = 7,4; (2) pH = 5,5. Cazul concentraţiei variabile de LD-aspartat.

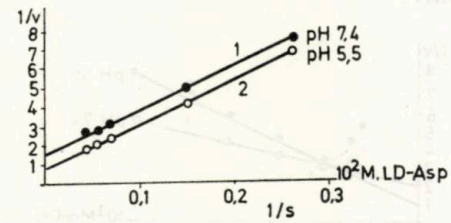


Fig. 4. — Cinetica GOT din spermatozoizii de taur la diferite pH-uri (1) pH = 7,4; (2) pH = 5,5. Cazul concentraţiei variabile de LD-aspartat.

Mai semnalăm aici faptul că cinetica GOT din plasma seminală se modifică în urma scăderii pH-ului după cum reiese din figurile 5 şi 6.

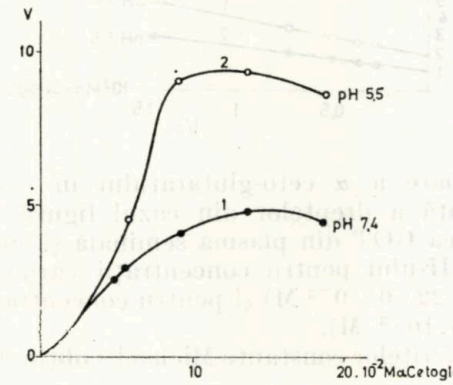


Fig. 5. — Variaţia activităţii GOT din plasma seminală cu creşterea concentraţiei de α ceto-glutarat (1) pH=7,4; (2) pH = 5,5.

Curbele care reprezintă variaţia activităţii (V) transaminazice în funcţie de concentraţia substratului (C) iau un aspect sigmoidal la pH = = 5,5 în comparaţie cu cel hiperbolic de la pH = 7,4. Cum aspectul acestor curbe dă indicaţii cu privire la structura proteinei enzimatice şi al mecanismului său de autoreglare, faptul ne sugerează ipoteza că variaţia activităţii GOT cu pH-ul se datoreşte unor modificări conformaţionale specifice, care depind de originea transaminazelor. În cazul spermatozoizilor, modificarea acestor curbe cu pH-ul este mult mai mică şi nesemnificativă, ceea ce poate fi corelat cu faptul că valorile constantelor Michaelis se modifică foarte puţin prin creşterea concentraţiei în ioni de hidrogen.

Structura izoenzimatică a GOT din plasma seminală. Cu ajutorul metodei de cromatografie pe coloana descrisă mai sus s-a determinat polimorfismul transaminazei din plasma seminală. Separarea izoenzimelor prin gel-filtrare s-a efectuat pe cel puțin cîte 5 cazuri diferite din loturi cu caractere morfofiziologice și biochimice ale spermei asemănătoare. În

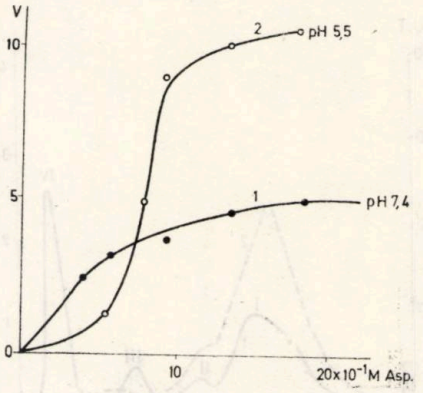


Fig. 6. — Variația activității GOT din plasma seminală cu creșterea concentrației de LD-aspartat (1) pH = 7,4; (2) pH = 5,5.

figuri se reprezintă doar rezultatele unui singur caz din lotul respectiv. Menționăm că s-au ales cazurile tipice care sînt dealtfel asemănătoare cu ale reprezentanților lotului analizat. Din figurile care urmează rezultă

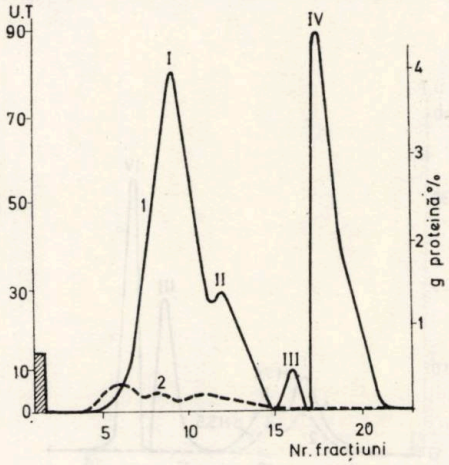


Fig. 7. — Gel-filtrarea pe Sephadex G-100 a plasmei seminale de taur, (1) activitatea GOT (I, II, III, IV: izoenzime); (2) proteină.

că numărul izoenzimelor este cel mai frecvent egal cu 4. În figurile 7 și 8 se reprezintă activitatea GOT a fracțiunilor separate prin gel-filtrare din plasma seminală.

Izoenzimele II și III sînt de obicei mai puțin active și mai slab individualizate. Uneori chiar pot lipsi, în special izoenzima II. Există o anumită corelație între mărimea fracțiunilor proteice și activitatea unor izoenzime. Cu cît prima fracțiune proteică se găsește în cantitate mai

mare, cu atît izoenzima I este mai puțin activă, și invers. Afirmația se poate verifica din inspecția curbelor 1 și 2 trasate în figurile de mai sus. O altă particularitate a cromatogramei GOT este aceea că între activitatea totală a plasmei seminale (coloana haşurată din stînga figurilor) și aceea a ultimei izoenzime există un raport cantitativ direct, valorile crescînd sau descrescînd în același sens.

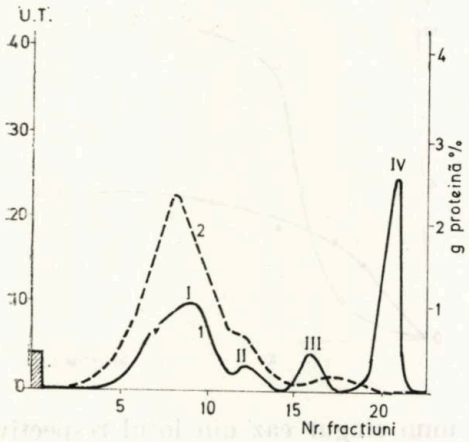


Fig. 8. — Gel-filtrarea pe Sephadex G-100 a plasmei seminale de taur, (1) activitatea GOT (coloana haşurată reprezintă activitatea inițială a plasmei seminale. Aceeași semnificație în figurile 7—10); (2) proteină.

Influența concentrației ionilor de hidrogen asupra prezenței și activității izoenzimelor este arătată în figurile 9 și 10.

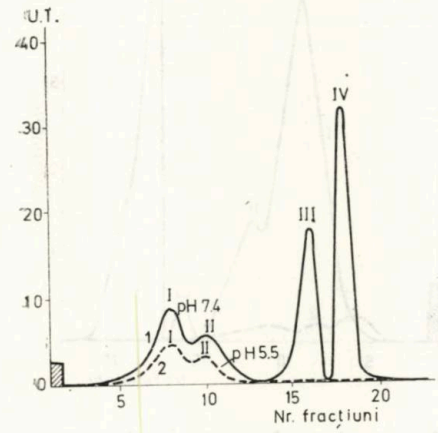


Fig. 9. — Variația activității GOT, separată prin gel-filtrare pe Sephadex G-100 a plasmei seminale de taur, în funcție de pH (1) pH = 7,4; (2) pH = 5,5.

Se remarcă faptul că activitatea izoenzimelor la pH = 5,5 este scăzută în raport cu aceea de la 7,4. Cel mai puternic este influențată, de obicei, izoenzima III (vezi fig. 9), a cărei activitate este total inhibată. Din figura 10 mai rezultă că odată cu inhibiția izoenzimei III se produce și o deplasare a izoenzimei IV către regiunea cu greutăți moleculare

mai mari. Reiese că izoenzima III are cel mai pronunţat caracter de transaminază citoplasmatică, pe cînd izoenzimele I şi IV pe acela al transaminazelor de origine mitocondrială.

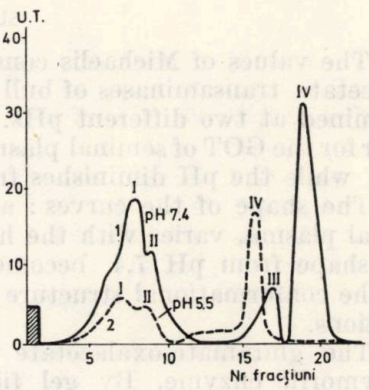


Fig. 10. — Variaţia activităţii GOT, separată prin gel-filtrare pe Sephadex G-100 a plasmei seminale de taur, în funcţie de pH (alt caz), (1) pH = 7,4; pH = 5,5.

Corelaţia dintre aspectul cromatogramelor GOT din sperma de taur şi calităţile fiziologice ale reproducătorilor face obiectul unei alte lucrări în curs de elaborare.

CONCLUZII

1. Se determină valorile constantelor Michaelis (K_{mA} şi $K_{m\alpha C}$) pentru glutamat-oxalacetat aminotransferaza (E.C.2.6.1.1.) din plasma seminală şi spermatozoizii de taur. Scăderea pH-lui de la 7,4 la 5,5 influenţează mai mult valoarea acestor constante în cazul plasmei seminale decît al spermatozoizilor.

2. Variaţia activităţii enzimatice în funcţie de concentraţia substratului ia un aspect sigmoidal la pH = 5,5, spre deosebire de cel hiperbolic de la pH = 7,4. În cazul GOT din spermatozoizi, această modificare nu se produce.

3. GOT din plasma seminală este o enzimă polimorfică, numărul izoenzimelor fiind în majoritatea cazurilor egal cu 4. La pH = 5,5 activitatea izoenzimelor se micşorează. Cea mai puternic influenţată este izoenzima III, care în toate cazurile este inactivată prin sporirea concenraţiei în ioni de hidrogen.

Prezentat la redacţie la 16 ianuarie 1973

Laboratorul de biochimie,
Facultatea de zootehnie
Institutul agronomic
„N. Bălcescu"
Bucureşti

THE ISOENZYMES AND THE KINETICS OF GLUTAMATE OXALACETATE AMINOTRANSFERASE (E.C.2.6.1.1.) OF BULL SEMINAL PLASMA

SUMMARY

The values of Michaelis constants (K_{mA} and $K_{m\alpha C}$) of the glutamate-oxalacetate transaminases of bull seminal plasma and spermatozoa are determined at two different pHs. The modification of these constants is higher for the GOT of seminal plasma in opposition with that of spermatozoa, while the pH diminishes from 7.4 to 5.5.

The shape of the curves : activity *vs.* substrate concentration, for seminal plasma, varies with the hydrogen ions concentration. The hyperbolic shape from pH 7.4 becomes sigmoidal at pH=5.5 which proves that the conformational structure of enzyme protein is modified in these conditions.

The glutamate-oxalacetate transaminase from seminal plasma is a polymorfic enzyme. By gel filtration on Sephadex G—100 we succeeded to separate the isoenzymes whose number varies between 2—4.

The activity of isoenzymes decreases with the increasing of hydrogen ions concentration (from pH=7.4 to 5.5). The isoenzyme III is completely inactivated on this occasion.

BIBLIOGRAFIE

1. L. M. Buruiană, M. Suţeanu, Lucrările ştiinţifice, Institutul agronomic „N. Bălcescu", seria C, **XI**, 221 (1968).
2. S. C. Magee, A. T. Phillips, Biochemistry, **10**, 3397 (1971).
3. J. Nisselbaum, O. J. Bodansky, J. biol. Chem., **239**, 4232 (1964).
4. C. Şelaru, St. cerc. biochim., **10**, 341 (1967).
5. C. Şelaru, St. cerc. biochim., **11**, 75 (1968).
6. R. J. Flipse, Dairy Sci., **43**, 773, (1960).
7. L. M. Buruiană, E. Hadarag, Lucrările ştiinţifice, Institutul agronomic „N. Bălcescu", seria C, **VI**, 375 (1964).
8. N. Gluhovschi, M. Roşu, M. Bistriceanu, P. Bilcea, E. Ianovici, Gh. Gluhovschi, Rev. Zoot. Med. Vet., **5**, 32 (1968).
9. S. Reitman, S. Frankel, Amer. J. Clin. Path., **28**, 56 (1956).
10. G. L. Miller, Anal. Chem., **31**, 964 (1969).
11. G. F. Fleisher, C. S. Potter, K. G. Wakim, Proc. Soc. Exptl. Med., **103**, 229 (1960).
12. E. Schmidt, F. W. Schmidt, E. Wildhurt, Klin. Wschr., **36**, 172 (1958).

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 3, 287–294 (1973)

MODIFICĂRI BIOCHIMICE SURVENITE LA TUBERCULELE DE CARTOFI DIN SOIURILE CARPATIN, COLINA ŞI GALBEN TIMPURIU IRADIATE CU RAZE GAMA

O. CHITA, D. TĂNĂSESCU, VERONICA STOENESCU şi V. DARIE

Rezumat. — La soiurile de cartof Carpatin, Colina şi Galben timpuriu iradiate cu raze gama (Co^{60}) în anii 1969 şi 1970 au fost analizate în X_2 şi X_3 proteinele solubile, cu ajutorul electroforezei în gel de poliacrilamidă, acidul ascorbic şi amidonul.

S-a constatat că variaţiile acestor componente sînt dependente de soi, de doza de iradiere utilizată şi de numărul de iradieri efectuate.

Este binecunoscut, astăzi, faptul că radiaţiile ionizante pot să determine modificări esenţiale, cu largi implicaţii metabolice, asupra unui număr mare de plante cultivate.

Rezultatele ce se obţin depind atît de materialul biologic utilizat, cît şi de o serie de factori ce ţin, printre altele, de natura radiaţiilor, de intensitatea şi de debitul sursei folosite. Efectele pozitive sau negative obţinute se datoresc acţiunii iradierii, care determină fie modificări globale de producţie, fie modificări ale unor componente biochimice ca: proteine, lipide, glucide, vitamine etc. [4]—[6], [10]—[14], fie inhibări ale unor procese biologice vitale [3], [7]—[9], [12].

Cu toate eforturile depuse pînă în prezent, mai sînt încă multe aspecte incomplet precizate, fapt care încurajează continuarea acestui tip de cercetări. În articolul de faţă, continuînd o serie de cercetări anterioare [1]—[3] privitoare la acţiunea radiaţiilor gama asupra plantelor de cartof din prima generaţie şi următoarele, am analizat efectul lor asupra unor componente biochimice la tuberculele de cartof din X_2 şi X_3. Pornind de la faptul că o serie de cercetări făcute la cartof privind efectul iradierii asupra producţiei, a conţinutului în amidon şi acid ascorbic au evidenţiat, prin folosirea unor doze mici, anumite efecte pozitive, ne-am întrebat dacă în cazul folosirii unor doze mari, cu efect mutagen, nu se vor obţine efecte similare.

MATERIAL ŞI METODE

Ca material biologic s-au folosit tuberculele de cartof din soiurile Carpatin, Colina şi Galben timpuriu. Au fost iradiate cîte 20 de tubercule pentru fiecare din cele 5 doze diferite, utilizate, cuprinse între 6 000 şi

10 000 r în cazul soiurilor Colina şi Carpatin şi între 1 000 şi 3 000 r pentru soiul Galben timpuriu.

În cazul soiurilor Carpatin şi Colina s-a efectuat o primă iradiere a tuberculelor în 1969.

Tuberculele rezultate au fost iradiate cu doze identice în anul 1970. Analizele biochimice au fost efectuate la tuberculele din generaţiile X_2 şi X_3, iradiate o singură dată în 1969 sau iradiate consecutiv în anii 1969 şi 1970.

Soiurile Colina şi Carpatin au fost iradiate la GUAMEC-Craiova, utilizîndu-se o sursă de Co^{60} cu activitate de 2,2 Ci.

Soiul Galben timpuriu a fost iradiat o singură dată (1970) la IAEA Viena, utilizîndu-se o sursă de Co^{60} cu activitate de 4 200 Ci şi o intensitate de 130 rad/sec.

Pentru determinările biochimice: electroforeza proteinelor în gel de poliacrilamidă, dozarea conţinutului de amidon şi de acid ascorbic, s-au luat, de la fiecare variantă, porţiuni din mai multe tubercule şi s-au prelucrat împreună.

Extracţia componentelor de analizat s-a făcut prin omogenizarea porţiunilor de tubercule, mărunţite în prealabil, cu ajutorul unui aparat Potter din sticlă şi într-o soluţie de tampon TRIS-HCl 0,05 M, pH = 7,5, în raportul 1/5 tubercule/tampon (g/ml).

După omogenizare, probele au fost centrifugate timp de 20 min la 6 000 rot/min.

Electroforeza proteinelor s-a realizat în gel de poliacrilamidă, vertical şi în strat subţire, în tampon TRIS—EDTA-borat, pH = 8,4 (15). Colorarea proteinelor s-a făcut cu o soluţie de Amidoschwartz 0,1% în acid acetic 7%. Excesul de colorant a fost îndepărtat prin spălări succesive cu acid acetic 2%.

Amidonul a fost dozat polarimetric, iar acidul ascorbic iodatometric.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Primele precizări de făcut erau următoarele:

— dacă în urma iradierii apar modificări calitative sau cantitative ale fracţiunilor proteice separate electroforetic;

— dacă între aceste fracţiuni proteice sînt diferenţe calitative la cele trei soiuri de cartof analizate.

Am considerat firesc să cercetăm aceste aspecte, ţinînd seama că o mare parte din proteinele solubile au şi funcţii biologice şi, ca urmare, modificările cantitative şi calitative care apar constituie dovezi clare că s-au produs modificări în procesul de biosinteză a proteinelor şi, aşadar, în diverse metabolisme.

De asemenea era necesar să cunoaştem dacă între cele trei soiuri există diferenţe notabile privind fracţiunile proteinelor solubile, pentru a putea aprecia comparativ transformările induse prin iradiere.

Analizînd proteinogramele probelor iradiate, comparativ cu martorul respectiv, am constatat atît modificări cantitative, cît şi calitative.

Astfel, la soiul Galben timpuriu (fig. 1), la varianta 3 (1 500 r) se produc modificări cantitative şi calitative evidente mai ales la nivelul

fracțiunilor principale cu viteză de migrare medie. La V_5 (2 500 r) și V_6 (3 000 r) se observă apariția a două fracțiuni cu viteză de migrare mai mare, care nu au fost identificate la celelalte probe.

La tuberculele soiului Colina, iradiate o singură dată, se constată la V_3 (7 000 r) o creștere cantitativă a celor două fracțiuni principale cu viteză de migrare medie, în timp ce la V_5 și V_6 (9 000 și 10 000 r) apar unele fracțiuni suplimentare, cu viteză de migrare mică (fig. 2).

După o dublă iradiere la același soi se constată numai la V_6 o modificare atît cantitativă, cît și calitativă a proteinogramei, evidențiindu-se apariția unei fracțiuni principale care se intercalează între celelalte fracțiuni (fig. 3).

La soiul Carpatin se produce o modificare cantitativă a fracțiunilor proteice solubile, la tuberculele iradiate 2 ani consecutiv cu 8 000 și 9 000 r (fig. 4).

Analizînd comparativ proteinogramele martorilor celor trei soiuri, se pot vedea diferențe notabile în ce privește viteza de migrare a principalelor fracțiuni proteice, dar mai puțin în ce privește numărul lor total, care este 9 la Carpatin, 8 la Colina și 9 la Galben timpuriu.

Aceste diferențe cantitative și calitative ale proteinelor solubile la cele trei soiuri denotă implicit și diferențe metabolice, fapt care va explica, în parte, comportarea diferită după iradiere în ceea ce privește variația conținutului în amidon și în acid ascorbic.

Dependent de soi și de doza de iradiere, conținutul celor două componente, în unele cazuri, se modifică substanțial comparativ cu valorile obținute la martori.

Astfel, la soiul Colina se constată că, în cazul unuei singure iradieri, se produce o creștere evidentă a conținutului în vitamină C, mai ales la variantele 4 și 5 (8 000 și 9 000 r), unde valorile obținute sînt duble față de cele obținute la martor. La variantele dublu iradiate, pentru aceleași doze, am înregistrat însă valori mai mici decît la martor, aspectul curbei fiind diametral opus (fig. 5).

Conținutul în amidon nu se modifică semnificativ la nici o variantă, valorile obținute fiind apropiate de cele ale martorului.

La soiul Carpatin, spre deosebire de soiul precedent, în variantele iradiate o singură dată conținutul în vitamină C crește mult mai puțin, fiind semnificativ mărit doar la variantele 3 și 6 (7 000 și 10 000 r). La probele dublu iradiate, cantitatea de vitamină C crește considerabil față de martor și se menține la un plafon ridicat în toate variantele (fig. 6). De asemenea și conținutul în amidon este sensibil modificat la toate variantele atît simplu, cît și dublu iradiat. La variantele simplu iradiate, conținutul în amidon crește la început proporțional cu doza de iradiere (V_2—V_4), după care scade sub valoarea înregistrată la V_5, iar în V_6 este egal cu cel al martorului. La cele dublu iradiate, cantitatea de amidon este crescută la V_2 (6 000 r) și apoi scade proporțional cu doza de iradiere pînă la V_6 (10 000 r), la care este mai mică decît la martor.

La soiul Galben timpuriu (fig. 7), aspectul diagramelor care reprezintă modificările conținutului în vitamină C și amidon este asemănător cu cel constatat la soiul Carpatin, iradiat o singură dată.

Rezultatele obținute demonstrează că iradierea cu doze mutagene determină în mod neîndoielnic modificări asupra bagajului enzimatic al

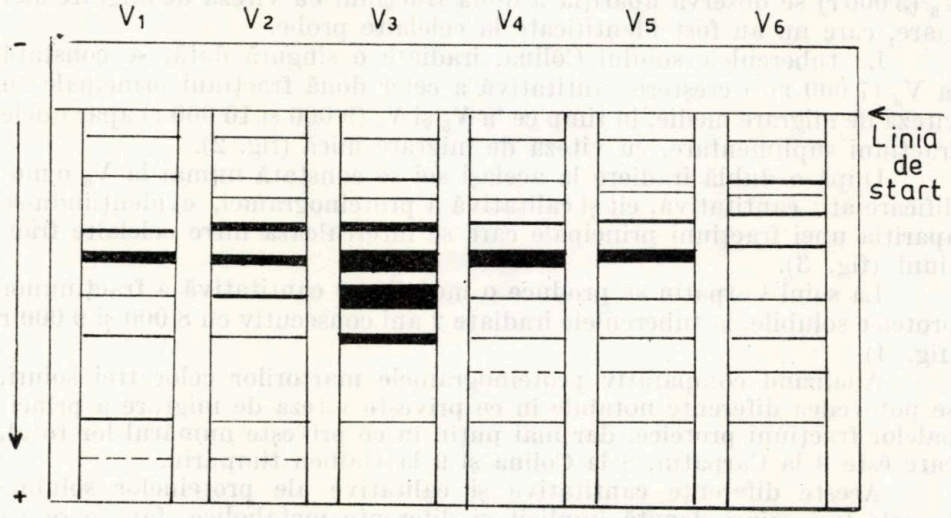


Fig. 1. — Diagrama electroforezei în gel de poliacrilamidă a proteinelor din tuberculele soiului Galben timpuriu. V_1 = martor neiradiat; V_2—V_6 = probe iradiate cu doze cuprinse între 1 000 și 3 000 r.

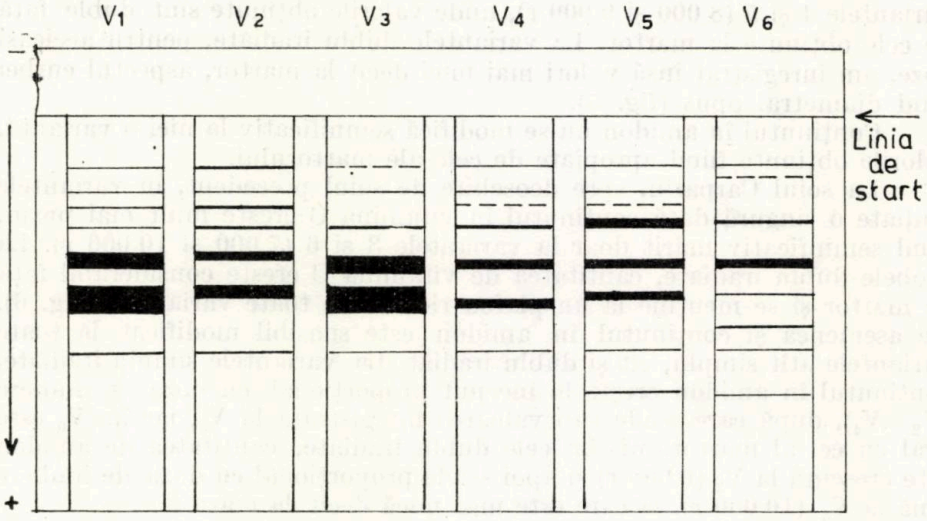


Fig. 2. — Diagrama electroforezei în gel de poliacrilamidă a proteinelor din tuberculele soiului Colina, iradiate o singură dată (1969). V_1 = martor neiradiat; V_2—V_6 = probe iradiate cu doze cuprinse între 6 000 și 10 000 r.

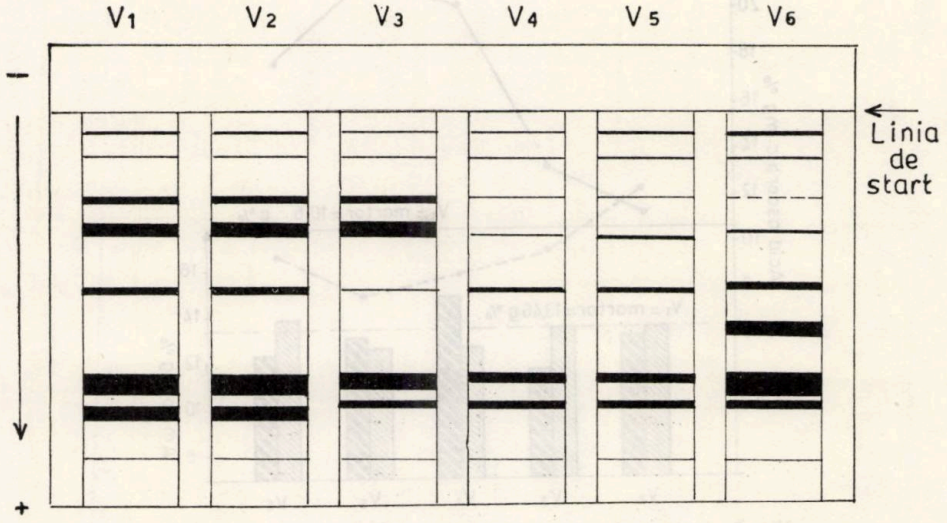


Fig. 3. — Diagrama electroforezei în gel de poliacrilamidă a proteinelor din tuberculelə soiului Colina iradiate de două ori (1969, 1970). V_1 = martor neiradiat; V_2—V_6 = probe iradiate cu doze cuprinse între 6 000 și 10 000 r.

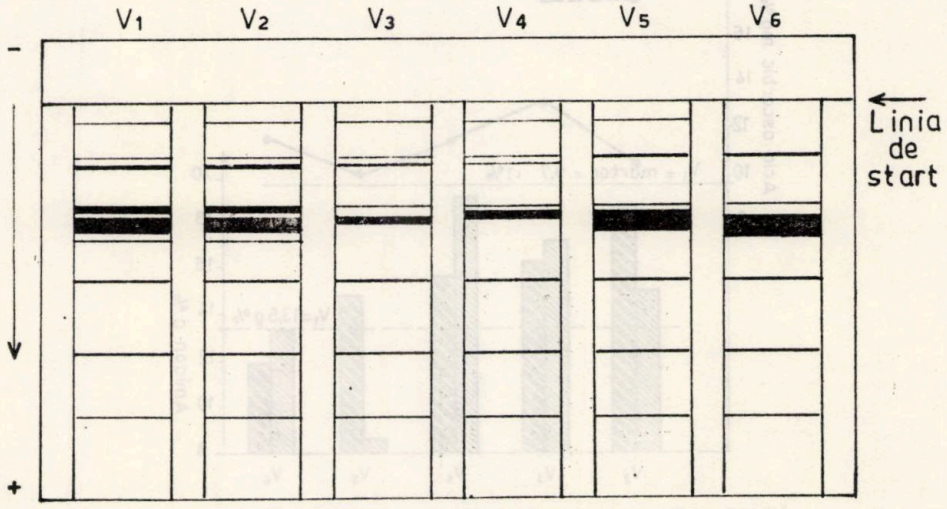


Fig. 4. — Diagrama electroforezei în gel de poliacrilamidă a proteinelor din tuberculele soiului Carpatin, iradiate de două ori (1969, 1970). V_1 = martor neiradiat; V_2—V_6 = probe iradiate cu doze cuprinse între 6 000 și 10 000 r.

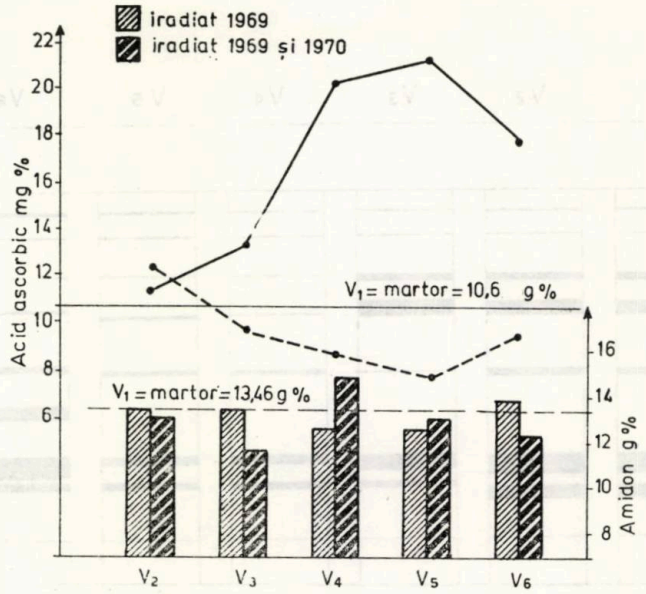


Fig. 5. — Diagrama conținutului în amidon și acid ascorbic la tuberculele soiului Colina, simplu și dublu iradiate cu doze cuprinse între 6 000 și 10 000 r.

—— probe iradiate o singură dată (1969);
····· probe iradiate de două ori (1969, 1970).

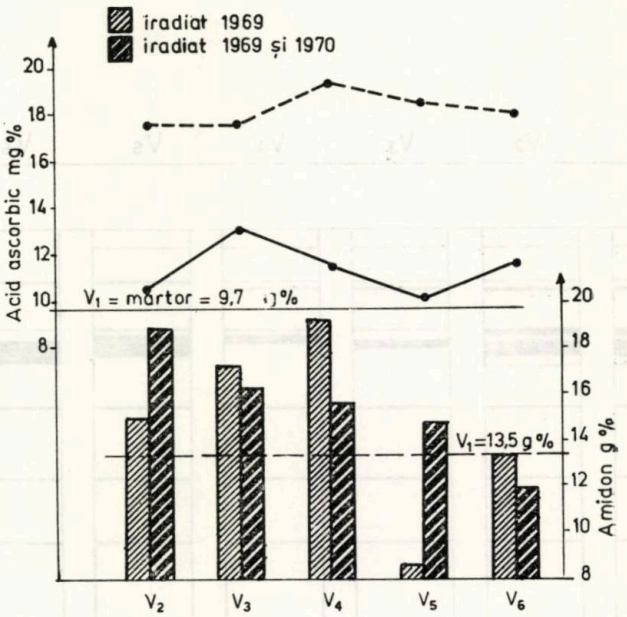


Fig. 6. — Diagrama conținutului în amidon și acid ascorbic la tuberculele soiului Carpatin, simplu și dublu iradiate, cu doze cuprinse între 6 000 și 10 000 r.

—— probe iradiate o singură dată (1969);
····· probe iradiate de două ori (1969, 1970).

plantei de cartof, fapt care se repercutează, printre altele, și asupra conținutului de amidon și acid ascorbic. Aceste modificări sînt dependente de soi, de numărul de iradieri și de doza utilizată.

Astfel se constată un paralelism destul de strîns între soiurile Carpatin și Galben timpuriu, deoarece atît conținutul de acid ascorbic, cît și cel de amidon se modifică în același sens.

Efectul iradierii duble reiese în mod evident în cazul soiurilor Carpatin și Colina, la care conținutul de acid ascorbic și amidon diferă considerabil în funcție de numărul de iradieri.

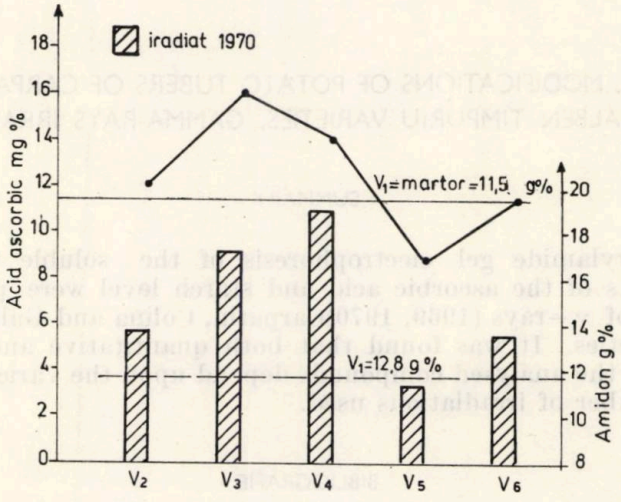


Fig. 7. — Diagrama conținutului în amidon și acid ascorbic la tuberculele soiului Galben timpuriu, iradiate o singură dată cu doze cuprinse între 1 000 și 3 000 r.

—— probe iradiate o singură dată (1970).

În sfîrșit, modificările constatate depind de doza utilizată. Este însă de remarcat faptul că variațiile constatate la cele trei componente analizate nu sînt maxime la aceleași doze. Deci modificările metabolice au posibilități specifice, prin care se vor putea modifica cantitativ anumite componente într-un sens dorit.

Cercetări ulterioare vor aduce, fără îndoială, precizări suplimentare asupra sensului, gradului și persistenței efectelor induse de iradierile cu raze gama.

CONCLUZII

Iradierea cu raze gama determină modificări evidente ale conținutului de acid ascorbic și amidon, precum și modificări calitative și cantitative ale proteinogramelor.

Toate aceste trei componente se modifică dependent de trei factori principali, şi anume : soiul utilizat, numărul de iradieri şi doza de iradiere.

Primit la redacţie la 28 martie 1973

Universitatea Craiova
Facultatea de şt. naturale
Disciplina genetică
şi
Facultatea de medicină
Catedra de biochimie

BIOCHEMICAL MODIFICATIONS OF POTATO TUBERS OF CARPATIN, COLINA AND GALBEN TIMPURIU VARIETIES, GAMMA-RAYS IRRADIATED

SUMMARY

Polyacrylamide gel electrophoresis of the soluble proteins and measurements of the ascorbic acid and starch level were performed on X_2 and X_3 of γ—rays (1969, 1970)Carpatin, Colina and Galben timpurîu potato varieties. It was found that both quantitative and qualitative variations of the analysed compounds depend upon the variety, the doses and the number of irradiations used.

BIBLIOGRAFIE

1. O. Chita, L. Georgescu, St. cerc. biol., Seria botanică, **21**, 87 (1969).
2. O. Chita, F. Păunel, L. Georgescu, Bulet. şt. Univ. Craiova, **10**, 125 (1968).
3. O. Chita, V. Stoenescu, Anal. Univ. Craiova, **III**, 127 (1969).
4. K. Kaindl, H. Linser, Bayer Landw J. B., **42**, 11 (1965).
5. A. M. Kuzin, Proc. U. N. Int. Conf. PUAE, **12**, 149 (1955).
6. Z. Menyehert, A. Balint, Bayer Landw J. B., **42**, 61 (1965).
7. K. Mikaelsen, H. K. Brenna, R. Landfall, Proc. sec. Int. Conf. Geneva, 1958, p. 401.
8. K. Mikaelsen, Acta Agric. Scandinavica, **VI**, 145 (1956).
9. K. Mikaelsen, L. Roer, Risö Report, **16**, 65 (1960).
10. K. Sax, Amer. J. Bot., **42**, 360 (1955).
11. K. Sax, Rad. Bot., **3**, 179 (1963).
12. S. Stan, C. Beratlief, *Utilizarea izotopilor radioactivi şi a radiaţiilor ionizante în agricultură*, 1970, Ed. Ceres, Bucureşti.
13. A. Süss, Atompraxis, **9**, 86 (1963).
14. A. Süss, A. Haisch, Rad. Bot., **4**, 439 (1964).
15. D. Tănăsescu, N. Moldoveanu, St. cerc. biochim., **11**, 320 (1968).

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 3, 295–300 (1973)

INFLUENȚA IONILOR DE LITIU ASUPRA FOSFORILĂRII OXIDATIVE ȘI A ACTIVITĂȚII SUCCINATDEHIDROGENAZEI DIN MITOCONDRII

VALENTINA JURCĂ

Rezumat. — S-a cercetat *in vitro* efectul ionilor de litiu asupra metabolismului energetic și a activității succinatdehidrogenazei în mitocondriile de ficat și de creier.

În funcție de natura mitocondriei, litiul adăugat în concentrații egale în mediul de incubație a acționat diferit asupra consumului de oxigen, a esterificării fosfatului anorganic, a cîtului P/O și asupra activității succinatdehidrogenazei. Rezultatele obținute sugerează o corelație între modificarea metabolismului energetic și dozele de litiu în terapia tulburărilor nervoase.

Primele observații referitoare la acțiunea litiului asupra organismelor vii aparțin lui Cade [1]. În urma experiențelor întreprinse în 1949, autorul semnalează efectul letargic al litiului la cobai, sugerînd utilizarea acestui element în tratamentul maladiilor nervoase.

Bastrup și Schou [2], după numeroase cercetări clinice, ajung la concluzia că acest element este un factor specific în tratamentul stărilor de manii și hipomanii, ca și în profilaxia stărilor maniacodepresive. Marea sa specificitate a dus la ideea că sărurile de litiu pot constitui totodată un test farmacologic important pentru studiul fiziopatologiei afecțiunilor depresive. Astfel, Perkinson și colab. [3], în urma unei analize comparative între acțiunea farmacologică și biochimică a litiului cu a antidepresanților-etalon, ajung la concluzia că litiul constituie un inhibitor reversibil al butirilcolinesterazei din plasma sanguină de cîine și din creierul de șobolan. Chesnais și colab. [4] au pus în evidență scăderea activității bioelectrice a preparatelor izolate de inimă, în soluție Ringer, cînd sodiul este substituit de litiu. Alți cercetători semnalează influența litiului asupra sintezei proteinelor [5], precum și asupra metabolismului acidului glutamic [6] din encefalul de șoarece, care este considerat neuromediatorul excitațiilor. Sheard și Aghajanian [7] au pus în evidență accelerarea metabolismului serotoninei din creier de către litiu. Szabo [8] semnalează că litiul administrat în primele zile de sarcină în doze de 465 mg/kg/zi provoacă moartea fetusului, 300 mg/kg/zi produc deformații numai ale palatului gurii, iar 200 mg/kg/zi nu prezintă asemenea efecte. Hadarag [9] a dovedit efectul specific al ionilor de litiu asupra pirofosfatazei cerebrale.

Din cele cîteva indicații bibliografice amintite reiese că influența litiului asupra organismelor vii ridică probleme care preocupă pe mulți

cercetători din diferite domenii, întrucît atît efectul său terapeutic, cît şi modul său de acţiune nu sînt pe deplin cunoscute.

Se presupune că litiul intervine în procesele de transport activ modificînd eficienţa pompei de sodiu prin acţiunea exercitată asupra ATP-azei din membrana celulară. Prin prezenţa sa el influenţează echilibrul ionic din ceulule şi activitatea unor enzime, provocînd astfel modificarea tipului de metabolism.

Pe baza acestor considerente şi în scopul de a stabili dacă între acţiunea terapeutică a litiului în diferite psihoze şi comportamentul său asupra metabolismului energetic există vreo corelaţie, am urmărit, mai întîi *in vitro*, acţiunea ionilor de litiu asupra fosforilării oxidative şi asupra activităţii succinatdehidrogenazei în mitocondriile de ficat şi de creier.

MATERIAL ŞI METODE

S-a lucrat pe mitocondrii de ficat şi de creier de şobolani, linia Gustav, în greutate de 200—250 g. Mitocondriile s-au obţinut prin centrifugări fracţionate, după tehnica descrisă într-o lucrare anterioară [10], cu deosebirea că obţinerea mitocondriilor de creier s-a făcut la 12000g.

Proteinele din suspensia mitocondrială au fost determinate prin metoda Lowry [11]. Fosfatul anorganic a fost dozat folosind metoda Fiske-Subbarow [12]. Consumul de oxigen a fost determinat cu tehnica manometrică Warburg. Mediul de reacţie (2 ml) a avut următoarea compoziţie : tampon fosfat de potasiu, pH = 7,5, 15 mM ; citocrom 0,02 mM ; $MgSO_4$ 6,7 mM ; succinat 10 mM ; EDTA 1 mM ; zaharoză 0,1 M ; glucoză 30 mM ; hexokinază 200—300 unităţi K M ; ATP 1 mM ; 7 mg proteină, mitocondrială ; 14 mM KF ; litiul în concentraţii variabile, sub formă de clorură de litiu.

Activitatea succinatdehidrogenazei s-a determinat manometric cu metoda Warburg, folosind tehnica descrisă de Schneider şi Potter [13]. Amestecul de reacţie (2 ml) conţinea : succinat de sodiu 0,5 mM ; tampon fosfat de potasiu pH = 7,4, 20 mM ; clorură de aluminiu şi clorură de calciu 0,002 mM ; citocrom c 0,02 mM ; 5 mg proteină mitocondrială, litiul în concentraţii variabile, sub formă de clorură de litiu.

Pentru determinarea fosforilării oxidative şi a activităţii succinatdehidrogenazei, timpul de incubare a fost de 20 min, la temperatura de 36°C. Faza gazoasă a fost aerul, bioxidul de carbon fiind absorbit cu 0,2 ml hidroxid de potasiu 20%, care era pus în centrul cuvelor.

REZULTATE

Comportarea litiului asupra consumului de oxigen ($\Delta 0$), a esterificării fosfatului anorganic (ΔP) şi a cîtului P/O este prezentată pentru mitocondriile de ficat în tabela 1, iar pentru cele de creier în tabela 2.

Din datele consemnate în tabele, reiese că sensul acţiunii litiului asupra acestor procese de importanţă majoră pentru viaţa celulară este în funcţie de concentraţia sa adăugată în mediul de incubaţie, cît şi în funcţie de natura mitocondriei.

În cazul mitocondriilor hepatice (tabela 1), litiul în concentraţiile cuprinse între 1,25 şi 15 mM nu a influenţat consumul de oxigen, captarea fosfatului anorganic din mediu şi valoarea raportului P/O. La 25, 50 şi 100 mM, litiul a stimulat uşor viteza de oxidare a succinatului, fosforilarea ADP— şi foarte puţin, însă nesemnificativ, raportul P/O. La 200 mM acţiunea litiului asupra acestor procese rămîne aproape nemodificată, manifestîndu-se doar o uşoară inhibare a esterificării fosfatului anorganic.

Tabela 1

Acţiunea litiului asupra fosforilării oxidative în mitocondriile de ficat *

Conc. Li^+ (mM)	Δ0 μatom/mg prot/h	ΔP μ moli/mg prot/h	P/O
—	4,09 ±0,015	7,60 ±0,015	1,88 ±0,009
1,25	4,05 ±0,015	7,53 ±0,020	1,83 ±0,005
2,50	4,08 ±0,009	7,74 ±0,014	1,89 ±0,006
5,00	4,29 ±0,013	7,77 ±0,018	1,86 ±0,008
7,50	4,44 ±0,017	7,98 ±0,026	1,80 ±0,009
10,00	4,68 ±0,009	8,04 ±0,010	1,77 ±0,006
15,00	4,80 ±0,14	8,10 ±0,009	1,80 ±0,008
25,00	5,24 ±0,005	10,20 ±0,011	1,94 ±0,010
50,00	5,28 ±0,016	10,80 ±0,021	2,04 ±0,011
100,00	5,31 ±0,008	11,10 ±0,016	2,09 ±0,006
200,00	5,22 ±0,014	10,32 ±0,009	1,97 ±0,007

* Datele din tabelă reprezintă medii a şapte determinări.

Capacitatea de fosforilare a mitocondriilor de creier (tabela 2) a fost uşor stimulată de litiu în concentraţia de 5 mM, iar la 7,5 şi 10 mM efectul său stimulator creşte. Concentraţia litiului de 15 mM inhibă uşor fosforilarea ADP la ATP, iar acest efect inhibitor se accentuează la 25 mM, rămînînd apoi nemodificat cu creşterea concentraţiei litiului la 50 şi 100 mM. Litiul în concentraţia de 200mM, adăugat în mediul de incubaţie, a mărit cantitatea fosfatului anorganic. Sursa acestui fosfat o constituie probabil, ATP adăugat sub acţiunea adenozintrifosfatazei.

Respiraţia mitocondriilor de creier (tabela 2) a fost uşor stimulată de ionii de litiu în concentraţiile cuprinse între 5 şi 10 mM. La 15 mM litiul a inhibat consumul de oxigen, iar la creşterea concentraţiei litiului acest efect inhibitor rămîne nemodificat.

Valoarea cîtului P/O creşte uşor la concentraţiile litiului de 7,5 şi 10 mM, iar la 15, 25 şi 100 mM ea scade treptat. La concentraţia litiului de 200 mM nu a mai avut loc formarea acidului adenozintrifosforic.

Deoarece în mitocondrii respiraţia cu fosforilarea nu sînt independente, ci procese strîns cuplate, modificarea unuia din cele două procese

determină o variaţie a celuilalt proces. Indiferent asupra căruia din cele două procese acţionează litiul prezent în mediul de incubaţie în anumite concentraţii, faptul că el provoacă creşterea sau scăderea cîtului P/O demonstrează că celălalt proces nu se modifică în mod echivalent. În funcţie de concentraţia în care este adăugat în mediul de incubaţie,litiul stimulează sau inhibă într-o măsură mai mare fosforilarea ADP decît consumul de oxigen de către mitocondrii, mai ales în cazul celor din creier. Date din literatură (37) arată că litiul în anumite concentraţii prezintă *in vivo* efect hipotermic.

Tabela 2

Acţiunea litiului asupra fosforilării oxidative în mitocondriile de creier

Conc. Li^+ (mM)	Δ0 μ atom/mg prot/h	ΔP μmoli/mg prot/h	P/O
—	4,68	7,70	1,64
	±0,009	±0,019	±0,007
1,25	4,65	7,75	1,66
	±0,006	±0,010	±0,010
2,50	4,83	7,83	1,62
	±0,010	±0,024	±0,005
5,00	5,01	8,82	1,76
	±0,012	±0,017	±0,008
7,50	5,03	10,26	2,04
	±0,011	±0,012	±0,011
10,00	5,10	10,36	2,03
	±0,007	±0,008	±0,007
15,00	3,69	6,88	1,59
	±0,020	±0,016	±0,007
25,00	3,68	4,96	1,35
	±0,013	±0,008	±0,009
50,00	3,60	4,75	1,35
	±0,014	±0,005	±0,010
100,00	3,60	4,21	1,11
	±0,005	±0,021	±0,009
200,00	3,38	2,18**	—
	±0,010	±0,007	

* Datele din tabelă reprezintă medii a opt determinări.
** Fosfat anorganic

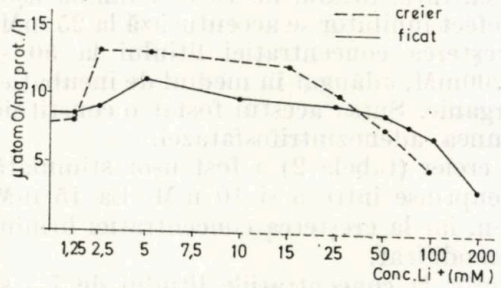


Fig. 1. — Acţiunea litiului asupra activităţii succinatdehidrogenazei din mitocondriile de ficat şi de creier.

Acţiunea litiului asupra succinatdehidrogenazei din mitocondriile de ficat şi de creier este prezentată în figura 1. Din valorile obţinute se constată că litiul în concentraţie de 5 mM stimulează activitatea succinatdehidrogenazei din mitocondriile de ficat, apoi efectul său rămîne aproape

nemodificat cu creşterea concentraţiei lui pînă la 50 mM. La 100 mM litiul manifestă o uşoară acţiune de inhibare a activităţii enzimatice, iar la concentraţia de 200 mM efectul său inhibitor creşte.

Cît priveşte succinatdehidrogenaza din mitocondriile de creier, activitatea ei este stimulată de litiu în concentraţia de 2,5 mM, rămînînd apoi nemodificată cu creşterea concentraţiei pînă la 15 mM. La 25 mM litiul inhibă activitatea succinatdehidrogenazei, apoi acţiunea sa inhibitoare creşte cu creşterea concentraţiei lui în mediul de incubaţie, încît la 100 mM activitatea acestei enzime este puternic inhibată.

Din rezultatele obţinute asupra fosforilării oxidative şi asupra activităţii succinatdehidrogenazei reiese că mitocondriile de creier sînt mult mai sensibile la acţiunea ionilor de litiu decît acelea ale ţesutului hepatic. Se poate deduce de aici că aceşti ioni exercită un efect specific asupra ţesutului cerebral, fapt ce explică acţiunea terapeutică a litiului în diferite psihoze.

Cele semnalate cu privire la sensul modificării metabolismului energetic şi a activităţii succinatdehidrogenazei în funcţie de concentraţia litiului sugerează că dozele de litiu folosite în terapeutica unor maladii nervoase nu sînt indiferente pentru organism.

CONCLUZII

1. Comportarea litiului asupra fosforilării oxidative şi asupra activităţii succinatdehidrogenazei din mitocondriile de ficat şi de creier este diferită în funcţie de concentraţia sa adăugată în mediul de incubaţie.

2. În general, litiul adăugat în concentraţii mici are un efect stimulator, iar la concentraţii ce depăşesc anumite limite se manifestă un efect inhibitor.

3. Mitocondriile de creier sînt, în această privinţă, cu mult mai sensibile decît cele hepatice.

Prezentat la redacţie la 10 ianuarie 1973

Laboratorul de biochimie,
Universitatea „Al. I. Cuza"
Iaşi

THE INFLUENCE OF LITHIUM OF THE OXIDATIVE PHOSFHORYLATION AND ON SUCCINICDEHYDROGENASE ACTVITY IN MITOCHONDRIA

SMUMARY

The *in vitro* effect of lithium on the oxidative phosphorylation and on the activity of mitochondrial succinic dehydrogenase from liver and brain is different with respect to concentration.

Lithium added in small amounts has a stimulating effect but, on the contrary, when the concentrations exceed certain limits an inhibitory effect is manifested.

The brain mitochondria are in this respect much more sensitive than those extracted from liver.

BIBLIOGRAFIE

1. J. F. J. Cade, citat de E. Hadarag, St. cerc. biochim., **13**, 37 (1970).
2. P. C. Baastrup, M. Schou, Arch. Gen. Psychiat., **16**, 162 (1967).
3. E. Perkinson, R. Ruckart, I. P. Da Vanza, Proc. Soc. exp. Biol. Med., **131**, 685 (1969).
4. I. M. Chesnais, M. P. Sauviat, I. M. Vassas, J. Physiol. (Paris), **61**, supl. 2, 244 (1969).
5. M. Volm, U. Schwartz, K. Woyss, Naturwissenschaften, **57**, 250 (1970).
6. F. V. De Feudis, I. M. R., Delgago, Nature (London), **225**, 749 (1970).
7. M. H. Sheard, G. K. Aghajanian, Life Sci., Part. I, A, 5, 285 (1970).
8. K. K. Szabo, Nature (London), **225**, 73 (1970).
9. E. Hadarag, St. cerc. biochim., **13**, 37 (1970).
10. V. Jurca, Anal. şt. Univ. „Al. I. Cuza", Iaşi, s. Ic., XIV, 121 (1968).
11. O. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, J. biol. Chem., **193, 265** (1951).
12. C. H. Fiske, Y. Subbarow, J. biol. Chem., **66**, 375 (1925).
13. W. C. Schneider, V. R. Potter, J. biol. Chem., **149**, 217 (1943).

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 3, 301–304 (1973)

DETERMINAREA FOSFORULUI ÎN SUBSTANȚELE SEPARATE PRIN CROMATOGRAFIE PE SILICAGEL

C. GH. MACAROVICI, B. BÖHM şi L. BOZAC

Rezumat. — În lucrarea de față s-a elaborat o metodă colorimetrică de determinare a fosforului, aplicabilă în tehnica cromatografiei pe strat subțire de silicagel. Interferența siliciului se elimină cu acid fluorhidric.

Cromatografia în strat subțire (C.S.S.) este în prezent larg utilizată în cercetările de biochimie, pentru separarea diferitelor componenți, printre care și clasa fosfolipidelor. În scop de exprimare cantitativă, la fracțiunile fosfolipidice se aplică de obicei dozarea fosforului.

În literatura de specialitate sînt descrise mai multe metode colorimetrice de determinare a fosforului, bazate pe reacția ionului PO_4^{3-} cu molibdatul de amoniu [1]—[3]. Molibdatul interferează cu siliciul, pentru că în prezența silicaților, pe lîngă fosfomolibdați se formează și silicomolibdați. Acest inconvenient împiedică folosirea metodei colorimetrice de determinare a fosforului pe bază de fosfomolibdat, în cadrul tehnicii C.S.S. pe silicagel.

Unii autori [4]—[6] încearcă eliminarea interferenței siliciului, în cazul compușilor fosfoorganici, prin extracția acestora cu solvenți organici, silicagelul fiind insolubil în acești solvenți. Această tehnică nu se poate folosi însă în cazul compușilor de fosfor anorganici; pe de altă parte, prin extracții interferența siliciului se poate elimina numai parțial.

În lucrarea de față am urmărit găsirea unei metode de determinare a fosforului din spoturile de pe stratul de silicagel, aplicabilă atît compușilor de fosfor organici, cît și celor anorganici.

PRINCIPIUL METODEI

După decuparea spoturilor, silicagelul decupat se tratează cu acid fluorhidric, siliciul trecînd în formă de H_2SiF_6 volatil. Fosforul se determină colorimetric.

REACTIVI

— acid fluorhidric conc.;
— acid sulfuric conc. sin. P.;
— acid azotic conc. sin. P.;
— izo-butanol;

— reactivul de molibdat (50 g molibdat de amoniu sînt dizolvate în 600 ml de apă distilată, apoi se adaugă 300 ml acid sulfuric diluat (1/1) şi se completează volumul cu apă distilată la 1000 ml);

— acid sulfuric 1 N;

— soluţie standard cu concentraţia de 1 microgram P/ml (obţinută prin dizolvarea a 43,9 mg H_2KPO_4 în apă distilată, aducînd apoi volumul soluţiei la 1000 ml). Soluţia de lucru se obţine prin diluarea soluţiei stoc;

— soluţia de $SnCl_2$ (soluţia stoc se prepară prin dizolvarea a 10 g $SnCl_2$ în 25 ml HCl conc.). Soluţia de lucru se obţine din soluţia de stoc printr-o diluare 1/10 cu H_2SO_4 1 N.

MERSUL ANALIZEI

Spotul decupat se introduce cantitativ într-un creuzet de platină. Se adaugă 1 ml acid sulfuric conc. În cazul compuşilor fosfoorganici se face mineralizarea prin adăugarea de 2—3 picături de acid azotic conc. şi se încălzeşte pînă la apariţia vaporilor de acid sulfuric. Se repetă adăugarea acidului azotic pînă la decolorarea probei, apoi se adaugă 2 ml de apă distilată şi se încălzeşte iarăşi, pînă la apariţia vaporilor de acid sulfuric. După răcirea probei se adaugă aproximativ 1 ml acid fluorhidric concentrat.

Proba se încălzeşte 20 minute pe baia de apă fierbinte, după aceea se adaugă aproximativ 5 ml apă distilată şi se mai ţine 10 minute pe baie de apă fierbinte. După răcirea probei se trece conţinutul creuzetului într-o pîlnie de separare de 50 ml, prin spălări repetate cu un volum total de aproximativ 25 ml apă distilată, adăugîndu-se apoi 2 ml de reactiv molibdat. După agitare se adaugă 6 ml izo-butanol, se agită 30 sec şi se lasă să se separe cele două faze. Faza apoasă se trece într-o altă pîlnie de separare şi se mai extrage încă o dată cu 6 ml izo-butanol. Faza apoasă se îndepărtează, iar cele două părţi de extract de izo-butanol din cele două pîlnii de separare se unifică şi se spală cu 1,5 ml de acid sulfuric 1 N. Soluţia de spălare se îndepărtează, se adaugă 1,5 ml reactiv de clorură

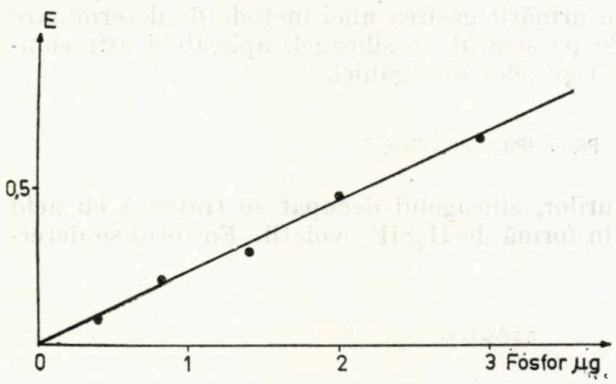


Fig. 1 — Curba etalon pentru fosfor (lungimea de undă 610 nm, cuva de 5 cm, Spectrocolorimetru SPECOL).

stanoasă şi se agită bine, după care soluţia de clorură stanoasă se îndepărtează. Extractul de izo-butanol, colorat în albastru, se introduce într-o eprubetă gradată de 10 ml şi se completează pînă la semn cu izo-butanol.

Se citeşte extincţia probei la lungimea de undă 610 nm, la fotocolorimetru (Specol), în cuve de 5 cm. Curba de etalonare se face între 0,3—4 micrograme de fosfor pe probă (fig. 1).

Punerea la punct a metodei s-a făcut folosind lecitină animală. Rezultatele recuperării fosforului din spoturile cu conţinut de lecitină, faţă de fosforul din lecitină mineralizată direct, fără prealabilă cromatografiere, sînt redate pe tabela 1.

Tabela 1

Recuperarea fosforului din spoturile de lecitină de pe plăci de silicagel faţă de fosforul din lecitină netrecută pe plăci

Fosfor găsit		
din lecitină (g)	din spoturi de lecitină (g)	recuperat (%)
0,4	0,41	102,5
0,81	0,805	99,38
1,18	1,19	100,85
1,60	1,58	98,75
1,91	1,91	100,0
3,1	3,00	96,8
4,00	4,10	102,5

Din tabela 1 se observă că determinarea cantitativă a fosforului din spoturi în tehnica C.S.S. (pe strat de silicagel) nu este deranjată în siliciu.

Prezentat la redacţie la 21 martie 1973

Institutul de sănătate publică şi cercetări medicale Cluj

PHOSPHORUS DETERMINATION IN THE SUBSTANCES SEPARATED BY SILICAGEL THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY

SUMMARY

In this paper it was elaborated a colorimetrical method for the determination of phosphorus, applicable in the technique of silicagel thin-layer chromatography.

The method is recommended for the determination of the phospholipids fractions from biological materials.

The interference of the silicon was eliminated with fluorhydric acid.

BIBLIOGRAFIE

1. I. P. Alimarin, Z. F. Sahova, P. K. Motorkina, DAN. SSSR, **106**, 61 (1956).
2. I. P. Riley, H. P. Williams, Mirochim. Acta, 820 (1959).
3. H. Grunze, Unterricht Thilo die Papierchromatographie der kondensierten Phosphate, Sitzungsberichte der deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Klasse für Mathematik und allgemeine Naturwissenschaften, Jahrgang, 1953, nr. 5, Akademie Verlag 1955, Berlin.
4. E. S. Brown, Amer. J. Physiol., **207**, 402 (1964).
5. T. E. Morgan, T. N. Finley, Fialkow, Biochim. Biophys. Acta., **106**, 403 (1965).
6. T. Fujiwara, F. H. Adams, S. Sipos, A. El-Salawy, Amer. J. Physiol., **215**, 375 (1968).

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 3, 305–308 (1973)

INFLUENȚA MEDIULUI DIN UNELE BIOTOPURI ALE ZONEI SUBCARPATICE ASUPRA CONȚINUTULUI ÎN AMINOACIZI LIBERI LA CÎTEVA SPECII DE NEVERTEBRATE

DINU PARASCHIVESCU și ILEANA HURGHIȘIU

Rezumat. — S-a efectuat un studiu comparativ asupra conținutului în aminoacizi liberi la unele specii de nevertebrate colectate din zona subcarpatică (Bogdănești și Gh. Gheorghiu-Dej), în perioada mai-iulie 1972.

S-au constatat modificări în conținutul aminoacizilor liberi de la specie la specie și în cadrul aceleiași specii de la un biotop la altul.

Se pun în evidență variații semnificative care sînt corelate cu condițiile ecologice diferite, precum și cu influența mediului poluat (exprimată prin inhibarea sintezei aminoacizilor). Apar modificări la cistină-cisteină, prolină, tirozină-metionină, valină și fenilalanină.

Cercetările efectuate asupra aminoacizilor la nevertebrate în general sînt reduse [1]—[5]. Studii mai aprofundate s-au efectuat la unele specii de insecte ce aparțin ordinelor : *Homoptera-Aphididae* [6], *Hymenoptera — Tenthredinidae* [7], *Formicidae* [8], *Lepidoptera-Bombycidae* [9].

În lucrarea de față prezentăm date noi asupra conținutului în aminoacizi liberi și modificarea acestora în funcție de condițiile ecologice la unele specii de nevertebrate din următoarele grupe : Gasteropode — *Arion rufus* L., dintre insecte ord. *Homoptera*, fam. *Aphydidae-Aphis fabae* Scop., ord. *Orthoptera*, fam. *Tettigonidae — Tettigonia viridissima* L., ord. *Coleoptera*, fam. *Coccinellidae-Coccinella 7-punctata* L. Aceste modificări ale aminoacizilor liberi prezintă un interes deosebit teoretic și practic.

MATERIAL ȘI METODĂ

Colectările de material din zona subcarpatică, Bogdănești și Gh. Gheorghiu-Dej, jud. Bacău, s-au făcut la speciile mai sus menționate în perioada mai—iulie 1972.

Biotopurile investigate au fost alese ca fiind egale în dimensiuni (20 × 20 m), situate în apropierea comunei Bogdănești,biotopul 1 și a municipiului Gh. Gheorghiu-Dej, biotopul 2. Altitudinea acestor terenuri este de aproximativ 400 m.

Biotopul 2 este situat în apropierea complexului petrochimic Borzești, unde se resimte puternic influența mediului poluat.

Vegetația componentă a celor două biotopuri investigate este în general asemănătoare, cu excepția speciilor *Crataegus monogyna* Jacq și *Rosa canina* L., frecvente în biotopul 1 (Bogdănești).

Colectarea materialului zoologic s-a făcut prin metoda cosirii cu fileul, care constă din mai multe cosiri, iar fiecare cosire se compune din 20—25 de mișcări orizontale și în zigzag. S-au luat 5 probe din fiecare biotop. Trierea materialului s-a făcut în laborator, separîndu-se pe grupe sistematice. Din materialul colectat, frecvența cea mai crescută au prezentat-o speciile de nevertebrate menționate. La acestea s-a determinat conținutul în aminoacizi liberi.

Pentru determinare s-a folosit literatura de specialitate [10]—[13].

Din materialul viu astfel colectat (cele 5 probe ale fiecărui biotop cercetat) s-a luat 1 g, care s-a mojarat cu apă distilată imediat după recoltare. Proteinele s-au precipitat cu acetonă clorhidrică 1% după metoda indicată într-o lucrare anterioară [8].

Reziduul obținut de la extracție care conține aminoacizi liberi s-a aplicat sub formă de spoturi pe hîrtia cromatografică MN 263. Migrarea s-a făcut ascendent, timp de 48 ore, într-un solvent format din n-butanol-acid acetic-apă 4 : 1 : 1. Cromatogramele s-au pulverizat cu ninhidrină 0,2% în butanol și s-au făcut aprecieri calitative.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele sînt cuprinse în tabela 1.

Din tabela 1 se constată că între diferitele grupe de nevertebrate cercetate în privința conținutului în aminoacizi liberi apar diferențe de la o specie la alta și în cadrul aceleiași specii de la un biotop la altul.

Menționăm că în general în biotopul 2 (Gh. Gheorghiu-Dej), numărul aminoacizilor este redus la toate speciile de nevertebrate investigate. Este posibil ca acest din urmă fapt să fie o consecință a influenței mediului poluat din zona biotopului 2 (Gh. Gheorghiu-Dej), situată în apropierea Complexului petrochimic Borzești.

În aceste condiții se constată că sinteza aminoacizilor liberi scade, iar metabolismul general al speciilor menționate este afectat.

CONCLUZII

1) Speciile de nevertebrate *Arion rufus* L., *Aphis fabae* Scop., *Tettigonia viridissima* L. și *Coccinella 7-punctata* L. prezintă unele modificări în conținutul aminoacizilor liberi de la o specie la alta și în cadrul aceleiași specii de la un biotop la altul.

2) Modificări semnificative apar la următorii aminoacizi: cistină-cisteină, prolină, tirozină-metionină, valină și fenilalanină.

Prezentat la redacție la 1 aprilie 1973

Institutul de științe biologice, București

Tabela 1

Modificarea conținutului în aminoacizi liberi la unele specii de nevertebrate

Aminoacizi	*Arion rufus*		*Tettigonia viridissima*		*Aphis fabae*		*Coccinella 7-punctata*	
	B I	B II	B I	B II	B I	B II	B I	B II
Cistină-cisteină	+	+	−	−	+	−	−	−
Lizină-histidină-arginină	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid aspartic-serină-glicocol	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid glutamic-treonină	+	+	+	+	+	+	+	+
Alanină	+	+	+	+	+	+	+	+
Prolină	−	−	+	−	−	−	−	−
Tirozină-metionină	+	+	+	−	+	+	+	−
Valină	+	+	+	+	−	+	+	+
Fenilalanină	+	−	+	−	+	−	+	−
Leucină	−	−	+	+	−	−	+	+

Notă: B I – biotopul 1 (Bogdănești), B II – biotopul 2 (Gh. Gheorghiu-Dej). Încadrările din tabelă reprezintă diferențele dintre biotopurile cercetate.

THE MEDIUM INFLUENCE OF SOME BIOTOPE FROM THE SUBCARPATHIAN ZONE ON THE CONTENT IN FREE AMINO ACIDS IN A FEW INVERTEBRATE SPECIES

SUMMARY

A comparative study was carried out concerning the content in free amino acids of some Invertebrates captured in the Subcarpathian zone (Bogdănești and Gh. Gheorghiu-Dej) between May—July 1972.

Modifications have been found in free amino acids content in the different species and in the same species from one biotope to another.

Significant variations have been recorded, in correlation with the different ecological conditions and with the influence of the polluting environment (expressed by the inhibition of amino acids synthesis).

Modifications are found in cysteine-cystine, proline, tyrosine-methionine, valine and phenylalanine.

BIBLIOGRAFIE

1. I. Agrill, Acta Phys. Scand., **18**, 247 (1949).
2. P. S. Chen, E. Hadorn, Rev. Suis. Zool., **61**, 437 (1954).
3. A. Drilhon, C. R. Soc. Biol., **144**, 224 (1950).
4. G. Duchateau, M. Florkin, Arch. Int. Physiol. Biochem., **66**, 573 (1954).
5. G. R. Wyatt, Ann. Rev. Ent., **6**, 12 (1961).
6. J. L. Auclair, J. Ins. Physiol., **2**, 330 (1958).
7. A. Zamfirescu, I. Hurghișiu, St. cerc. biochim., **15**, 311 (1972).
8. D. Paraschivescu, I. Hurghișiu, St. cerc. biochim. (sub tipar).
9. A. Drilhon, R. G. Busnel, Rev. Ver. a Soie, **1**, 51 (1949).
10. W. Knechtel, A. Popovici-Bîznoșanu, *Orthoptera Fauna R.P.R.*, Edit.Academiei, București, 1959.
11. M. A. Ionescu, *Entomologie*, Edit. de stat didactică și pedagogică, București, 1962.
12. M. A. Ionescu, M. Lăcătușu, *Entomologie*, Edit. didactică și pedagogică, București,1971.
13. P. Grassé, *Traité de Zoologie*, V. fasc. III; Masson et Cie Editeurs, Paris, 1968.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 3, 309–312 (1973)

CAROTINEMIA LA ANIMALE PARAZITATE. I. CAROTINEMIA LA OVINE PARAZITATE CU NEMATOZI GASTROINTESTINALI DIN FAMILIA *TRICHOSTRONGYLIDAE*

V. TĂMAȘ, ECATERINA ANGI și E. ȘUTEU

Rezumat. — S-a determinat conținutul în β-carotină al serului sanguin la ovine infestate cu nematozi gastrointestinali din familia *Trichostrongylidae*. Se constată o corelație între gradul de infestație și conținutul în β-carotină, și anume cu cît infestația este mai puternică, cu atît cantitatea de β-carotină este mai mică.

În ultimii ani s-au izolat diferite carotinoide și metaboliți ai lor din țesuturi animale, limfă și plasmă [1]. Cele mai multe dintre cercetări au fost axate pe rolul carotinoidelor ca precursori ai vitaminelor A [2]. Mai puține au fost cele care au vizat aspecte legate de absorbția carotinoidelor [3], [4] și de factorii endogeni implicați în acest proces [5].

Este cunoscut faptul că pentru organismul animal β-carotina este indispensabilă, fiind cea mai importantă provitamină A.

În sîngele ovinelor sănătoase, conținutul în β-carotină este de 150—300 de micrograme la 100 ml de ser. Acumularea acestei carotinoide în sînge este dependentă de starea sănătății animalului. Absorbția ei din produsele furajere poate fi stînjenită de prezența paraziților gastrointestinali.

În prezenta lucrare ne-am propus să urmărim carotinemia la ovinele infestate cu nematozi gastrointestinali, prin determinarea conținutului în β-carotină din serul sanguin.

MATERIAL ȘI METODE

S-a lucrat pe ovine adulte, metișI F_2 (țurcană × merinos transilvănean) de la Ferma didactică a Institutului agronomic din Cluj. S-au alcătuit 4 loturi de cîte 3 oi fiecare. Ca martor a servit lotul 1, iar loturile 2, 3 și 4 au fost infestate natural cu nematozi din familia *Trichostrongylidae*. Cercetările au fost efectuate în perioada octombrie 1971 — august 1972, în așa fel ca să se parcurgă perioada : toamnă, iarnă, primăvară și vară.

Examenul parazitologic (ovohelmintoscopic). Pentru testarea infestării animalelor cu *Trichostrongylidae* s-au recoltat probe coprologice

direct din rect, cîte 5 grame de fiecare probă. Pentru examenul ouălor de nematozi s-a utilizat metoda de flotație, iar pentru numărarea ouălor metoda McMaster [6].

Pentru calcularea numărului ouălor de *Trichostrongyli* per gram de fecale (E.P.G.) s-a utilizat următoarea relație [6]: $E.P.G. = \frac{n \times 100}{2}$, în care n reprezintă numărul de ouă găsite pe cele două suprafețe ale lamelei. Media valorilor înregistrate la cele 3 oi ale fiecărui lot sînt prezentate în tabela 1.

Pentru determinarea gradului de infestare în funcție de numărul de ouă/gram fecale, s-au stabilit trei grade de infestație:

— 1—100 ouă/gram fecale, infestație slabă;
— 100—500 ouă/gram fecale, infestație medie;
— peste 500 ouă/gram fecale, infestație puternică.

Pentru urmărirea dinamicii sezoniere și a intensității invaziei de nematozi s-au făcut patru controale la toate cele patru loturi studiate, și anume:

— la 25.X.1971, pentru sezonul de toamnă;
— la 20.II.1972, pentru sezonul de iarnă;
— la 15.V.1972, pentru sezonul de primăvară;
— la 20.VII.1972, pentru sezonul de vară.

La aceste date au fost efectuate și determinările β-carotinei din ser. Cele patru loturi de ovine au fost furajate uniform.

Determinarea conținutului în β-carotină al serului sanguin s-a făcut prin metoda spectrofotometrică, prin măsurarea extincției moleculare la 465 nm, în soluție benzenică [7]—[9].

Probele de sînge s-au recoltat în ziua examinării, utilizînd ca anticoagulant 2 ml soluție de citrat de sodiu 3,8%. După coagulare, probele au fost centrifugate.

Din serul obținut s-au luat 5 ml și s-au pus într-un balon de 100 ml, la care s-au adăugat 15 ml etanol 95% și 2 ml soluție KOH 11 N. Amestecul s-a pus pe baie de apă la 70—80°C și s-a ținut timp de 1/2 oră. După răcire s-a făcut extracția β-carotinei, utilizînd 75 ml de eter de petrol. Extracția s-a făcut de trei ori cu cîte 25 ml de eter de petrol; la prima extracție s-a scuturat timp de 5 minute, iar la a doua și a treia cîte 2 minute. Extractele reunite s-au spălat cu apă distilată, în prezență de fenolftaleină, pînă la dispariția culorii roz. S-a trecut soluția pigmentului în eter de petrol printr-un strat de Na_2SO_4 anhidru. S-a evaporat solventul la sec, în prezență de N_2. Peste reziduul de evaporare s-au adăugat 5 ml de benzen. Această soluție, după uscare peste carbonat de sodiu anhidru, s-a spectrofotometrat la un spectrofotometru Zeiss, tip VSU-1.

Calculul conținutului în β-carotină s-a făcut după o scală-etalon preparată cu β-carotină autentică.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Determinările ovohelmintoscopice și de β-carotină sînt prezentate în tabela 1.

Din datele prezentate în tabela 1 reies următoarele:

Infestarea cu nematozi gastrointestinali provoacă o scădere a conţinutului în β-carotină al serului sanguin. La fiecare din datele efectuării analizelor, această scădere a fost cu atît mai pronunţată, cu cît gradul de infestare cu nematozi era mai ridicat. Sub acest aspect, influenţa infestării cu nematozi se manifestă cel mai puternic iarna, cînd diferenţa de conţinut în β-carotină serică dintre lotul martor şi lotul cu gradul de infestare cel mai ridicat atinge nivel maxim (0,090 mg), atenuîndu-se apoi treptat pînă în vară, cînd această diferenţă devine minimă (0,052 mg). La toate loturile, conţinutul în β-carotină al serului manifestă o pronunţată creştere în primăvară cînd oile se hrănesc cu iarbă.

Tabela 1

Rezultatele analizelor ovohelmintoscopice la fecale şi conţinutul mediu în β-carotină al serului sanguin
(loturi de cîte 3 animale, valori medii)

Data analizei	Determinarea	Loturi			
		1 (martor)	2	3	4
25.X.1971	Nr. de ouă la 1 g fecale	—	800	500	900
	grad de infestare	neinfestat	puternic	mediu	puternic
	β-carotină mg/100 ml	0,260	0,206	0,220	0,197
20.II.1972	Nr. de ouă la 1 g fecale	—	500	300	700
	grad de infestare	neinfestat	mediu	mediu	puternic
	β-carotină mg/100 ml	0,220	0,150	0,170	0,130
15.V.1972	Nr. de ouă la 1 g fecale	—	100	100	400
	grad de infestare	neinfestat	slab	slab	mediu
	β-carotină mg/100 ml	0,290	0,240	0,260	0,230
20.VII.1972	Nr. de ouă la 1 g fecale	—	300	100	500
	grad de infestare	neinfestat	slab	slab	mediu
	β-carotină mg/100 ml	0,272	0,230	0,260	0,220

CONCLUZII ŞI RECOMANDĂRI

1. La ovinele infestate cu nematozi din familia *Trichostrongylidae*, conţinutul de β-carotină al serului sanguin este mai mic decît la cele neinfestate.

2. Scăderea conţinutului în β-carotină este cu atît mai accentuată, cu cît infestarea este mai puternică. Totodată, ea se manifestă mai pronunţat iarna, cînd nutreţurile conţin, în general, cantităţi minime de carotinoide.

3. Este deci necesar să se dea o deosebită atenţie furajării ovinelor infestate, îndeosebi în perioada de iarnă, acţionîndu-se concomitent pentru combaterea infestării, condiţie esenţială de care depinde atît dezvoltarea ovinelor, cît şi producţia lor.

Prezentat la redacţie la 20 martie 1973

Disciplina de biochimie
Disciplina de biologia paraziţilor,
Facultatea de medicină-veterinară,
Institutul agronomic „Dr.
Petru Groza", Cluj

CAROTENEMIA OF PARASITIZED ANIMALS

I. CAROTENEMIA OF SHEEP PARASITIZED BY GASTROINTESTINAL NEMATODES BELONGING TO THE *TRICHOSTRONGYLIDAE* FAMILY

SUMMARY

The β-carotene content of the blood serum of sheep, infested by gastrointestinal nematodes belonging to the *Trichostrongylidae* family, is negatively correlated with the infestation degree.

BIBLIOGRAFIE

1. D. F. Cheesman, W. L. Lee şi P. F. Zagalsky, Biological Reviews, **42**, 131 (1967).
2. O. Isler, *Carotenoids*, Birkhäuser Verlag, Basel-Stuttgard, 1971, p. 717.
3. St. R. Targan, S. Merril şi Ar. D. Schwabe, Clin. Chem., **15**, 479 (1969).
4. H. S. Huang şi D. W. S. Goodman, J. Biol. Chem., **240**, 2 839 (1965).
5. W. L. Marusich, E. Schildknecht, E. F. Ogrinz, P. R. Brown şi M. Mitrovic, Br. Poult. Sci., **13**, 577 (1972).
6. R. Wetzel, *Tierärztl. Umschau*, **6**, 209 (1951).
7. C. Petrescu, V. Tascenco, F. Saghin, I. Feredan şi L. Lupan, *Analiza tehnică a nutreţurilor*, Bucureşti, Edit. agro-silvică, 1967, p. 90.
8. W. Kubler şi H. Lorenz, Intern Z. Vitaminfosforsch., **33**, 411 (1963).
9. V. Tămaş, Gh. Sălăjan şi C. Bodea, St. cerc. biochim., **13**, 423 (1970).

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 3, 313–316 (1973)

NOTĂ DE LABORATOR

ADAPTAREA TEHNICII DE FIXARE CU HIDROXID DE SODIU LA DETERMINAREA FOSFOCREATINEI DIN MUȘCHIUL GASTROCNEMIAN DE BROASCĂ ÎN CONTRACȚIE

LORA SCOLNIC

Rezumat. — Tehnica de fixare cu hidroxid de sodiu s-a adaptat la determinarea fosfocreatinei din mușchiul gastrocnemian de broască în excitație simplă sau cu travaliu. Se arată că hidroxidul de sodiu poate înlocui azotul lichid.

Majoritatea numeroaselor metode de determinare a fosfocreatinei din mușchi utilizează pentru fixarea acestora azotul lichid. Mai accesibilă este însă metoda Jendrassik și Faiszt [1], care utilizează ca fixator hidroxidul de sodiu.

Medeșan [2] semnalează că aplicarea celor două tehnici de fixare dă, la mușchiul în repaus, valori comparabile, în timp ce la mușchiul excitat, fixat în hidroxid, nivelul fosfocreatinei este mult crescut față de cel găsit în cazul fixării cu azot lichid.

Am presupus că neconcordanța rezultatelor obținute la mușchiul excitat s-ar datora faptului că fosfocreatina degradată s-ar resintetiza imediat după încetarea contracției și că viteza pătrunderii soluției de hidroxid în mușchi nu ar fi suficientă pentru a surprinde starea mușchiului înainte ca resinteza fosfocreatinei să aibă loc.

Trebuie să amintim că, deși în metoda preconizată de Jendrassik și Faiszt [1] introducerea mușchiului excitat în soluția de hidroxid se face în decurs de 0,1—0,2 sec, el este lăsat aici intact timp de 10 min, după care este apoi prelucrat în vederea dozării fosfocreatinei.

Efectuînd o secțiune transversală prin mușchiul gastrocnemian introdus timp de 10 min în soluție de hidroxid și aplicînd suprafața acesteia pe hîrtie de turnesol, am constatat, după cum era de așteptat, că soluția de hidroxid nu pătrunde pînă în interiorul mușchiului.

Întrucît tehnica de fixare cu hidroxid de sodiu este simplă și accesibilă oricărui laborator, ni s-a părut util să încercăm aplicarea ei și în cazul în care mușchii au fost supuși unui tratament în urma căruia modificările conținutului de fosfocreatină sînt imediat reversibile. Pentru aceasta era necesar să găsim un mijloc care să grăbească pătrunderea hidroxidului în mușchi. Am presupus că mărunțirea imediată a mușchiului introdus în soluția de fixare ar rezolva problema.

Experiențele au fost efectuate pe mușchi gastrocnemieni de broască (*Rana ridibunda*) *in situ* la temperatura laboratorului, supuși contracțiilor isotonice, cu și fără travaliu.

Excitarea s-a realizat cu un generator de impulsuri TUR-RS3, broasca fiind imobilizată pe o placă de lemn, după procedeul Macovschi şi colab. [3]. Cei doi muşchi au primit o excitaţie directă, obţinută în condiţii identice (3 min, 3 mA, 60 imp/min, durata unei excitaţii 5 m sec). Picioarele posterioare au fost tăiate simultan şi muşchii izolaţi simultan, cît mai curînd posibil, au fost introduşi unul în azot lichid, iar celălalt într-o soluţie de hidroxid de sodiu 10%.

Contracţia cu travaliu s-a realizat prin legarea unei greutăţi de piciorul posterior, la nivelul tendonului muşchiului supus unei excitări electrice.

Fixarea în hidroxid a fost efectuată astfel: muşchiul excizat rapid a fost introdus în 5 ml de hidroxid de sodiu 10% şi de asemenea, cît mai curînd posibil, mărunţit cu ajutorul unui foarfec. După 10 min se omogenizează în omogenizator Potter şi se aduce cu apă distilată la 20 ml. Determinarea fosfocreatinei în omogenatul alcalin, lăsat 30 min în repaus, s-a efectuat după Alexeeva [4].

După cum rezultă din tabela 1, la muşchiul excitat valorile obţinute pentru fosfocreatină sînt apropiate.

Tabela 1

Valorile fosfocreatinei din muşchii gastrocnemieni de broască supuşi *in situ* excitaţiilor electrice directe, în condiţii identice (3 min, 3 mA, 60 imp/min, durata unei excitaţii 5 m sec), determinate după fixare fie cu hidroxid de sodiu, fie cu azot lichid

Muşchi fixat în azot lichid = N_2
Muşchi fixat în hidroxid = NaOH

Greutatea muşchilor g		Creatinina mg/g muşchi umed determinat		Fosfocreatina mg/g muşchi umed calculat	
N_2	NaOH	N_2	NaOH	N_2	NaOH
0,51	0,54	1,93	1,41	2,11	2,63
0,83	0,87	1,03	1,10	1,92	2,05
0,63	0,60	0,90	1,02	1,68	1,90
0,55	0,52	0,85	0,97	1,59	1,81
Media 0,63	0,63	0,98	1,12	1,82	2,09

Tabela 2 arată că, deşi muşchii-pereche ai aceleiaşi broaşte s-au contractat identic, ei prezintă valori diferite ale conţinutului în fosfocreatină după cum mărunţirea lor s-a făcut imediat sau după 10 min de la imersarea în soluţia de hidroxid.

Tabela 3 arată că, şi în cazul contracţiei cu travaliu, mărunţirea imediată sau la 10 min dă valori diferite.

Rezultă că, la muşchiul excitat, metoda de fixare cu hidroxid poate fi folosită numai dacă mărunţirea muşchiului se realizează imediat după imersarea în soluţia de hidroxid, şi nu abia la 10 min, aşa cum indică Jendrassik şi Faiszt [1].

Această deficienţă de metodă explică faptul că, deşi la muşchii în repaus autorii menţionaţi găsesc valori comparabile cu cele date în literatură la fixarea cu azot lichid, la muşchii excitaţi ei nu găsesc modificări semnificative faţă de muşchiul în repaus.

Tot această deficiență a metodei Jendrassik și Faiszt a dus la prezumția neconfirmată [2] că în timpul contracției s-ar elibera, la fixarea în hidroxid, anumite substanțe ce interferează cu acidul picric, ca și la afirmația că în cazul fixării cu hidroxid reactivul Lloyd și-ar pierde specificitatea în ceea ce privește adsorbția creatininei [2].

Tabela 2

Influența intervalului de timp dintre introducerea mușchiului în hidroxid de sodiu 10% și mărunțirea lui asupra valorilor fosfocreatinei din mușchii gastrocnemieni de broască supuși *in situ*, excitațiilor electrice directe, în condiții identice (3 min, 3 mA, 60 imp/min, durata unei excitații 5 msec) obținute după tehnica de fixare cu hidroxid de sodiu. Un mușchi a fost mărunțit imediat după imersarea în hidroxid, celălalt după 10 minute

Mușchi mărunțit imediat după imersarea în hidroxid = M_0,
Mușchi mărunțit la 10 minute după imersarea în hidroxid = M_{10}.

	Greutatea mușchilor g		Creatinina mg/g mușchi umed determinat		Fosfocreatina mg/g mușchi umed calculat	
	M_{10}	M_0,	M_{10}>	M_0>	M_{10}>	M_0>
	1,00	1,00	2,19	1,56	4,10	2,92
	1,20	1,10	1,95	0,88	3,64	1,64
	0,80	0,83	2,60	1,85	4,85	3,45
	0,60	0,70	1,90	0,99	3,54	1,85
Media	0,90	0,91	2,16	1,32	4,03	2,46

Amintim că tehnica de fixare cu hidroxid a mai fost folosită și adaptată de noi și în vederea dozării fosfatului anorganic liber din mușchiul gastrocnemian de broască [5].

Tabela 3

Influența intervalului de timp dintre introducerea mușchiului în hidroxid de sodiu 16% și mărunțirea lui asupra valorilor fosfocreatinei din mușchii gastrocnemieni de broască supuși, *in situ*, contracției cu travaliu, în condiții identice (3 min, 3mA, 60 imp/min, durata unei excitații 5 m sec, greutăți fixate la mușchi 20 g), obținute după tehnica de fixare cu hidroxid. Un mușchi a fost mărunțit imediat după imersarea în hidroxid, celălalt după 10 minute

Mușchi mărunțit imediat după imersarea în hidroxid = M_0,
Mușchi mărunțit la 10 minute după imersarea în hidroxid = M_{10}.

	Greutatea mușchilor g		Creatinina mg/g mușchi umed determinat		Fosfocreatina mg/g mușchi umed calculat	
	M_{10}>	M_0>	M_{10}>	M_0>	M_{10}>	M_0>
	0,70	0,70	1,20	0,85	2,24	1,59
	0,80	0,75	1,37	1,20	2,56	2,24
	0,70	0,62	1,81	1,11	3,38	2,07
	0,50	0,52	1,70	1,20	3,17	2,24
Media	0,67	0,65	1,52	1,09	2,84	2,03

Rezultă că metoda de fixare cu hidroxid de sodiu, cu modificarea adusă de noi, poate fi aplicată cu succes la studiul fosfocreatinei din

mușchii excitați. Ea prezintă avantajul că este simplă, nu necesită azotul lichid uneori dificil de procurat și poate fi aplicată în orice laborator.

Prezentat la redacție la 27 ianuarie 1973

Institutul de științe biologice,
Departamentul de biochimie,
București

ADAPTATION OF THE FIXATION TECHNIQUE WITH SODIUM HYDROXIDE TO THE STUDY OF CREATINE PHOSPHATE IN FROG GASTROCNEMIUS MUSCLES DURING CONTRACTION

SUMMARY

The fixation technique with sodium hydroxide was adapted to the determination of creatine phosphate in frog gastrocnemius muscles during stimulation. It was found that sodium hydroxide can replace liquid nitrogen.

BIBLIOGRAFIE

1. L. JENDRASSIK și J. FAISZT, Ann. Sci. Budapest, Rolando Eötvos nom., Sect. Biol., **1**, 133 (1957).
2. C. MEDEȘAN, St. cerc. biochim., **7**, 67 (1964).
3. E. MACOVSCHI, C. IORDACHE și C. DRAGOMIRESCU, St. cerc. biochim., **4**, 171 (1961).
4. A. M. ALEXEEVA, Biohimia, **16**, 97 (1951).
5. L. SCOLNIC, Rev. roum. Biochim., **2**, 385 (1965).

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 3, 317–335 (1973)

ASUPRA BIOCHIMISMULUI FORMĂRII ŞI DEGRADĂRII ACIZILOR HUMICI

MIRCEA IONESCU

Cercetări referitoare la compoziţia materiei organice a solului au arătat că humusul are un conţinut în azot mai ridicat decît acela al plantelor din care el a luat naştere [9], [11], [12].

Din aceste date rezultă că substanţele humice trebuie să fie diferite de acelea care intră în alcătuirea organismelor vegetale şi că, avînd un conţinut mai mare în azot, ele nu pot reprezenta simple produse de degradare a materiei vegetale, care, în urma descompunerii, pierd în primul rînd din azotul lor. Aceste fapte au determinat pe Viliams să facă ipoteza că acizii humici se formează prin sinteză [2], [5], [6].

„Majoritatea cercetătorilor — spune Viliams — consideră humusul ca un produs intermediar în procesul de descompunere a materiei organice a solului, după cum arată Springel, Fischer, Schroder, Funchs [3]. Nu putem fi însă nicidecum de acord cu această concepţie, deoarece produsele de descompunere ar trebui să fie mai simple decît materia supusă descompunerii; în caz contrar, asistăm la un proces de sinteză". Viliams arată astfel, cel dintîi, că acizii humici nu formează simple produse intermediare în procesul de descompunere a materiei organice în sol, ci sînt produse rezultate dintr-un proces de sinteză; el nu arată însă în ce constă acest proces de sinteză.

Cercetările referitoare la compoziţia chimică a materiei organice a solului au arătat, de asemenea, prezenţa constantă a ligninei şi a proteinei în această materie. Această regularitate a dus la concluzia că ligninele materiei organice vegetale din sol şi substanţele proteice din microflora solului — care se formează în cantităţi nelimitate — sînt elementele de construcţie pe baza cărora se sintetizează acizii humici în sol.

Pe baza acestei constatări s-a emis ipoteza conform căreia humusul natural ar fi format dintr-un complex lignoproteic, la care pe cale fizică sau chimică, se însumează apoi alte combinaţii, ca acizi organici, zaharuri, alcooli, grăsimi etc. [2], [3], [13], [14].

La baza acestei ipoteze, emisă de S. Waksman (14), stau cîteva fapte care au arătat că lignina se poate combina direct cu proteinele, obţinîndu-se un complex artificial, ale cărui proprietăţi îl apropie de acelea ale acizilor humici naturali, şi anume:

1) introducînd în sol diferite proteine, acestea se transformă în complexe proteice noi, greu de descompus de către microorganismele din sol; rezistenţa acestui complex la acţiunea de descompunere bacteriană este foarte mare, deoarece el dă o cantitate minimă de amoniac, pe cînd

în absența ligninei, proteina elimină în același interval de timp 80% azot sub formă amoniacală;

2) energia de descompunere a humusului din sol (a acidului huminic) este comparabilă cu aceea a complexului ligno-proteic atît în privința cantității de CO_2 dezvoltate, cît și în privința cantității de azot eliberate sub formă amoniacală.

Experiențe paralele de descompunere a complexului proteic și a proteinei pure au arătat o producere de 3 ori mai mare de CO_2 și de 10 ori mai mare de amoniac în cazul proteinei pure decît în cazul complexului lignoproteic;

3) așezarea grupărilor aminice în acest complex este asemănătoare cu aceea din acizii humici ai solului (fără a se dovedi această aserțiune);

4) complexul se poate combina și cu bazele, putînd reține, alături de azot, și elemente minerale (Ca, Mg, Fe, Al), care se pot înlocui la fel ca și bazele din humați.

Pentru stabilirea naturii chimice a complexului ligno-proteic și pentru determinarea caracterului legăturii dintre lignină și proteină, s-a dat următorul mod de formare al acestui complex:

$$C_{52}H_{46}O_{11}(OCH_3)(COOH)(OH)_4C = O + H_2N-\underset{\displaystyle R}{\underset{|}{C}}H-COOH \rightarrow$$

$$C_{52}H_{46}O_{11}(OCH_3)(COOH)(OH)_4C=N-\underset{\displaystyle R}{\underset{|}{C}}H-COOH + H_2O.$$

Dar un atare complex artificial ligno-proteic, ca și mecanismul lui de formare, nu-l putem considera identic sau asemănător acizilor humici pentru următoarele motive:

1. Unitățile de bază ale ligninelor nu conțin nici o grupare cetonică sau chinonică și nici o constelație de duble legături cu efect batocrom care să le permită atît condensarea directă de tip iminic cu grupările amidogen (NH_3, amino-acizi), cît și apariția culorii pe care o au acizii humici.

2. Faptul că complexul ligno-proteic se poate combina cu bazele, pe care le poate reține, nu constituie o dovadă că între complexul ligno-proteic și acizii humici există o identitate sau o asemănare structurală; și aceasta deoarece capacitatea de a reține elementele minerale, de a determina fenomene de schimb, de a fi greu solubile și de a fi mai greu descompuse de microorganisme nu este caracteristică numai complexului ligno-proteic și acizilor humici, ci tuturor substanțelor coloide, care au mai ales un caracter acid.

3. Interacțiunea dintre lignină și proteine are loc în condiții atît de vitrege, încît în sol ea este foarte puțin probabilă [2].

Aceste fapte nu sînt deci de natură să dovedească că acizii humici au o structură chimică și o comportare identică cu aceea a complexului artificial ligno-proteic, și nici nu rezolvă problema formării humusului; aceasta deoarece, spre deosebire de complexul ligno-proteic, acizii humici sînt intens colorați, iar unii dintre ei sînt solubili (acizii fulvici, crenici).

Concepţia ligno-proteică a lui Waksman de formare a acizilor humici nu corespunde realităţii; ea a însemnat însă un pas înainte pentru cunoaşterea naturii humusului deoarece s-a putut stabili că la formarea lui participă lignina; această participare nu este însă directă, cum vom vedea, ci prin unităţile sale structurale, care o compun.

Cercetări datorite mai ales învăţaţilor ruşi Levakovski şi Slezkin şi acum în urmă Kvarkov, Tiscenko, Orlov şi alţii [7] au arătat că formarea acizilor humici în sol are loc numai pe contul substanţelor solubile în apă, rezultate din degradarea materiei organice vegetale a solului, şi că, în consecinţă, se pot humifica direct numai componentele chimice care intră în faza lichidă, nu şi lignina deci, a cărei solubilitate este prea mică.

Aceste aserţiuni nu sînt, după părerea noastră, la adăpostul oricărei critici, deoarece nu există substanţe absolut insolubile şi reacţiile chimice se pot petrece nu numai în fază lichidă, ci — cu viteză mai mică — ele au loc şi între două faze diferite: una lichidă şi alta solidă, greu solubilă.

În cercetările sus-menţionate, esenţial este însă faptul că formarea humusului are loc pe contul substanţelor rezultate din degradarea materiei organice vegetale a solului, care sînt solubile; aceste fapte duc la concluzia că la formarea acizilor humici nu participă direct lignina, ci unităţile ei structurale, rezultate din degradarea ei prealabilă şi care sînt solubile. Astfel, Tiscenko şi Orlov au observat că substanţele labile, rezultate din degradarea materiei organice vegetale, se humifică şi că, prin humificare, ele îşi modifică cu uşurinţă structura lor moleculară, devenind rezistente la degradare.

Combinaţiile de natură organică, solubile în apă, formează deci materialul din care ia naştere humusul, conclude Kwarkov [7].

Cercetările învăţaţilor ruşi au arătat, astfel, că la formarea acizilor humici nu participă deci direct lignina, greu solubilă, ci unităţile ei structurale mai mici — labile şi solubile, — ce apar din descompunerea ei prealabilă.

Cercetări efectuate înainte de 1960 — referitoare la degradarea hidrolitică şi oxidativă a acizilor humici izolaţi din sol — au contribuit, pe de altă parte, la stabilirea modului de formare şi a structurii chimice a acizilor humici (9). Aceste cercetări au arătat că la formarea acizilor humici participă, pe de o parte, substanţe de tip fenolic, respectiv derivaţii lor de structură chinonică, iar pe de altă parte aminoacizi.

Din datele de mai sus se desprind următoarele concluzii referitoare la formarea humusului în sol:

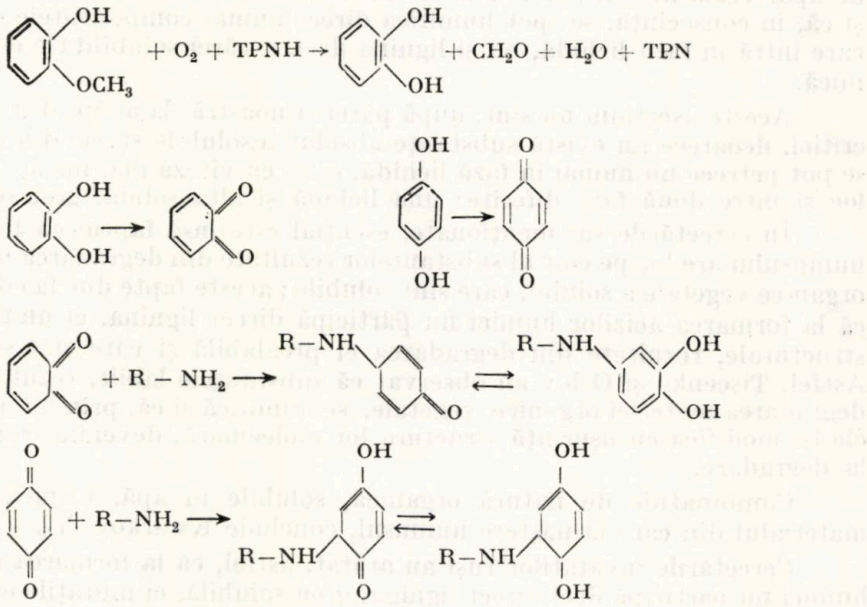
1. Formarea humusului în sol nu reprezintă un simplu produs intermediar în procesul de descompunere a materiei organice din sol; humusul apare ca rezultat al unui proces de sinteză (Viliams) [2], [5].

2. Ligninele materiei organice vegetale din sol în primul rînd şi substanţele proteice din microflora solului formează substanţele pe baza cărora se sintetizează humusul în sol [2], [14].

3. Sinteza humusului în sol are loc pe contul substanţelor rezultate din degradarea materiei organice vegetale, care sînt solubile; ligninele, greu solubile, nu participă direct deci la formarea humusului [7].

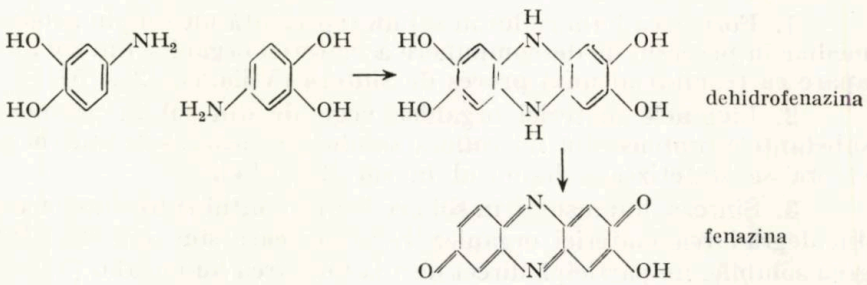
4. La formarea acizilor humici participă, pe de o parte, substanţe de tip fenolic, rezultate din degradarea ligninelor, iar pe de altă parte aminoacizi [9].

Procesul formării acizilor humici pe contul acestor substanţe de tip fenolic este datorit unor reacţii de demetilare a eterilor fenolici, de oxidare la chinone a difenolilor formaţi şi de adiţie la aceste chinone a substanţelor de tip aminic, reacţii pe care Flaig [9] le exprimă prin următoarele ecuaţii chimice :

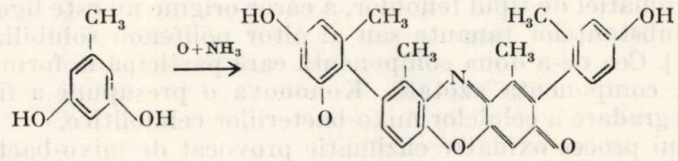


Ansamblul acestor reacţii de demetilare, de oxidare a difenolilor la chinone şi de adiţie a chinonelor sînt reacţii enzimatice. Reacţia de demetilare a unui eter fenolic, de exemplu, pe care am văzut-o mai sus, este o reacţie enzimatică, care nu poate avea loc decît în prezenţa trifosfopiridin-nucleotidului redus (TPNH).

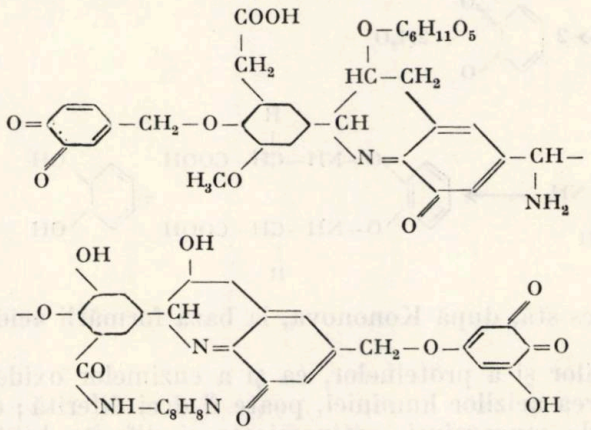
Aminofenolii, formaţi ca mai sus, se pot oxida mai departe, după Horner [9], pentru a da naştere, de exemplu, la substanţe humice a căror structură ar avea formula unor derivaţi ai dihidrofenazinei, uşor oxidabili în derivaţi ai fenazinei :



Tot astfel fenolii rezultaţi din degradarea ligninelor se pot condensa oxidativ cu amoniacul, pentru a da naştere la substanţe humice, a căror structură moleculară de bază ar avea, după Mousso [9], o formulă de tip oxazinic :

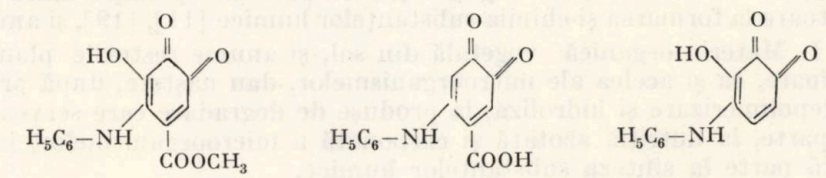


Pentru structura moleculară de bază a acizilor humici, Dragunov dă în 1948 următoarea formulă [7], [9], [15] :



Cercetările au arătat că materia humică propriu-zisă a solului reprezintă un produs de heteropolicondensare a substanţelor de tip fenolic cu substanţele azotate sub acţiunea enzimelor din unele microorganisme [9, p. 210]; de fapt Trusov este primul care în 1915 a arătat că procesul humificării are loc sub influenţa bacteriilor şi a ciupercilor [4], [16].

Pe baza datelor de mai sus, elementele de structură care intră în alcătuirea acizilor humici au fost reprezentate de Peive [9, p. 210] prin următoarele formule :



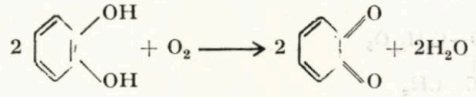
Acizii humici formează astfel edificii polimere cu greutate moleculară de 30 000—50 000 a unui monomer în care sînt prezente unităţile structurale ale fenolilor văzuţi.

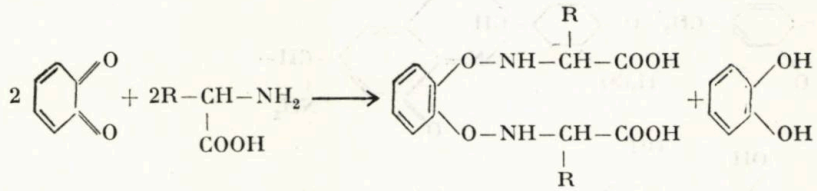
Reacţiile de degradare ale ligninelor la unităţile lor structurale, ca şi cele de oxidare a polifenolilor la chinone, sînt reacţii enzimatice, datorite activităţii microorganismelor din sol; în cazul polifenolilor, procesul oxidativ are loc prin intervenţia polifenol-oxidazei, în alcătuirea căreia

se găsește cuprul ca microelement; cercetările au dovedit că prin introducerea suplimentară a cuprului în solurile lipsite de acest element se activează formarea substanțelor humice [9].

Kononova a emis ipoteza că la formarea acizilor humici pot participa și compuși aromatici de tipul fenolilor, a căror origine nu este lignina, cum ar fi cazul substanțelor tanante sau al altor polifenoli solubili, [2, p. 322] [17]—[18]. Cea de-a doua componentă care participă la formarea acizilor huminici, componenta azotată, Kononova o presupune a fi cea a produselor de degradare a celulelor mixo-bacteriilor celulolitice.

Datorită unui proces oxidativ enzimatic provocat de mixo-bacterii, fenolii sînt convertiți la chinone, care apoi fixează aditiv azotul organic, conform unui mecanism de reacție exprimat în felul următor:





Un astfel de proces stă, după Kononova, la baza formării acidului huminic.

Originea polifenolilor și a proteinelor, ca și a enzimelor oxidative care participă la formarea acizilor huminici, poate fi deci diferită; enzimele pot fi secretate de mucegaiuri, actinomicete și diferite bacterii. Acizii huminici pot avea astfel o origine diferită, spune Kononova, dar între ei există asemănare din punct de vedere chimic.

Produsele care apar în cursul condensărilor văzute se pot modifica ulterior, pentru a ajunge la substanțe mai apropiate de alcătuirea acidului huminic din sol. Kononova numește aceste produse de condensare „substanțe prohumice".

Cercetări efectuate în ultimii zece ani de către diferiți oameni de știință, mai ales de către Flaig și alții, au adus noi și importante date referitoare la formarea și chimia substanțelor humice [11], [19], și anume:

I. Materia organică vegetală din sol, și anume resturile plantelor superioare, ca și acelea ale microorganismelor, dau naștere, după prealabilă depolimerizare și hidroliză, la produse de degradare care servesc, pe de o parte, la nutriția azotată și carbonată a microorganismelor, iar pe de altă parte la sinteza substanțelor humice.

Produsele de degradare suferă, în condiții aerolitice, un proces de combustie care conduce, în final, la formare de CO_2, H_2O, NH_3; aceste substanțe formează termenii finali ai metabolismului energetic.

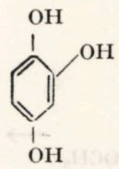
Produsele de degradare dau naștere, între altele, în condiții anaerobiotice, la diferiți fenoli, care se formează din lignine, care se separă mecanic din materia organică a țesutului vegetal sau care se sintetizează, ca noi, de către microorganisme, pe contul altor produse de degradare

decît acelea ale ligninelor sau al fenolilor preexistenţi ca atare în ţesutul vegetal.

Formarea fenolilor din lignină are loc prin degradare metodică; mai întîi are loc degradarea hidrolitică, în primul rînd a legăturilor eterice (demetilare etc.) Edificiul molecular al ligninei este dărîmat în fragmente moleculare mai simple, care formează etape intermediare între lignină şi unităţile ei de bază. Aceste unităţi sînt apoi convertite prin oxidare, prin hidroxilare şi prin decarboxilare. În cursul acestor reacţii se formează mono- şi polifenoli, precum şi acizi benzoici substituiţi. Deoarece unii dintre aceşti fenoli au o mare reactivitate chimică, ei dau polimeri, a căror alcătuire este însă diferită de cea a ligninei.

La unii dintre fenoli, în special la ortodifenoli, are loc prin oxidare o rupere a ciclului, cu formare de ceto-acizi, care pot fi folosiţi de microorganisme drept sursă de carbon; pe această cale se pierde însă o parte din compuşii fenolici care ar putea participa la formarea substanţelor humice.

În cursul formării substanţelor humice pe contul acestor fenoli, au loc diferite reacţii în care se formează, ca produse intermediare, radicali fenolici şi hidroxi-hidrochinonă:



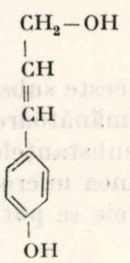
hidroxi-hidrochinonă

Astfel de combinaţii iau naştere fie sub acţiunea enzimelor fenoloxidante, fie prin autooxidare.

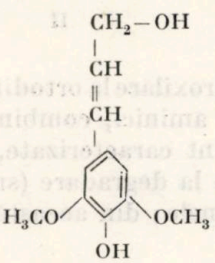
Prin condensarea ulterioară a fenolilor astfel obţinuţi, cu diferite proteine sau produse de degradare ale acestora, cum sînt peptidele, amonoacizii şi amoniacul, iau naştere substanţele humice, formate din acizi huminici şi fulvici (circa 80%), precum şi din baze humice (humine).

II. Fenolii sînt deci elementele de bază care alcătuiesc substanţele humice. Ei se formează în primul rînd prin degradarea ligninei şi, apoi, prin sinteză directă de către microorganisme:

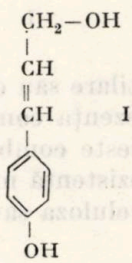
— *Fenolii, produse de degradare a ligninei.* Prin degradarea ligninelor, al căror conţinut în plante variază între 10 şi 30%, se formează, după cum au arătat Freudenberg şi colab. [1], [19], alcoolul coniferilic (I), alcoolul sinapinic (II) şi alcoolul cumaric (III):



I



II

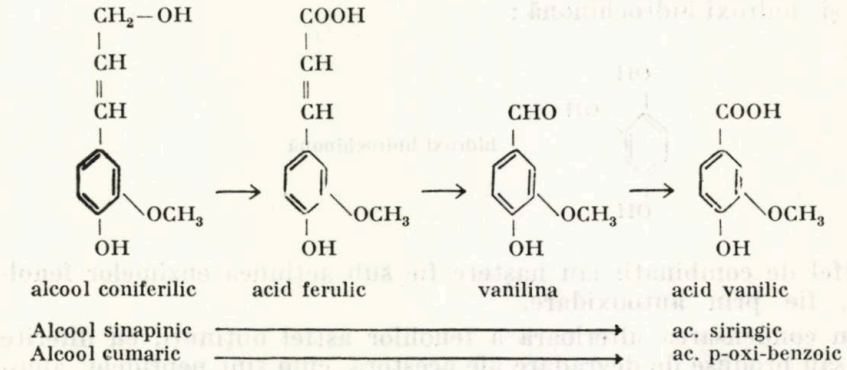


III

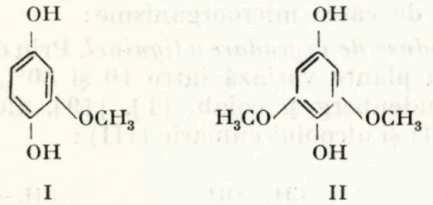
Aceste substanţe formează deci unităţile structurale de bază ale diferitelor lignine (din conifere, foioase şi ierboase); în alcătuirea ligninelor, aceste substanţe intră în proporţie diferită.

Caracteristic acestor unităţi de bază ale ligninelor este faptul că sînt fenoli ai scheletului fenil-propinic, pentru construirea căruia plantele folosesc, probabil, hexozele după un mecanism chimic care, după cunoştinţele noastre, încă nu a fost stabilit, dar pe care îl considerăm deosebit de important pentru a arăta unitatea diferitelor procese biochimice ce duc la formarea constituenţilor de bază ai substanţelor humice.

Prin oxidarea directă a ligninei sau prin acţiunea ciupercilor putregaiului alb asupra fenolilor fenil-acrilici, ca acidul ferulic, p-hidroxi-cinamic şi siringic, Lim şi Flaig, şi alţi cercetători [19], au arătat că scheletul fenil-propionic al unităţilor structurale ale ligninelor se degradează trecînd de la forma C_6-C_3 la forma C_6-C_1. În aceste condiţii se formează aldehide, care sînt oxidate în mediul de cultură la acizii corespunzători, precum şi la acid glioxilic şi oxalic:



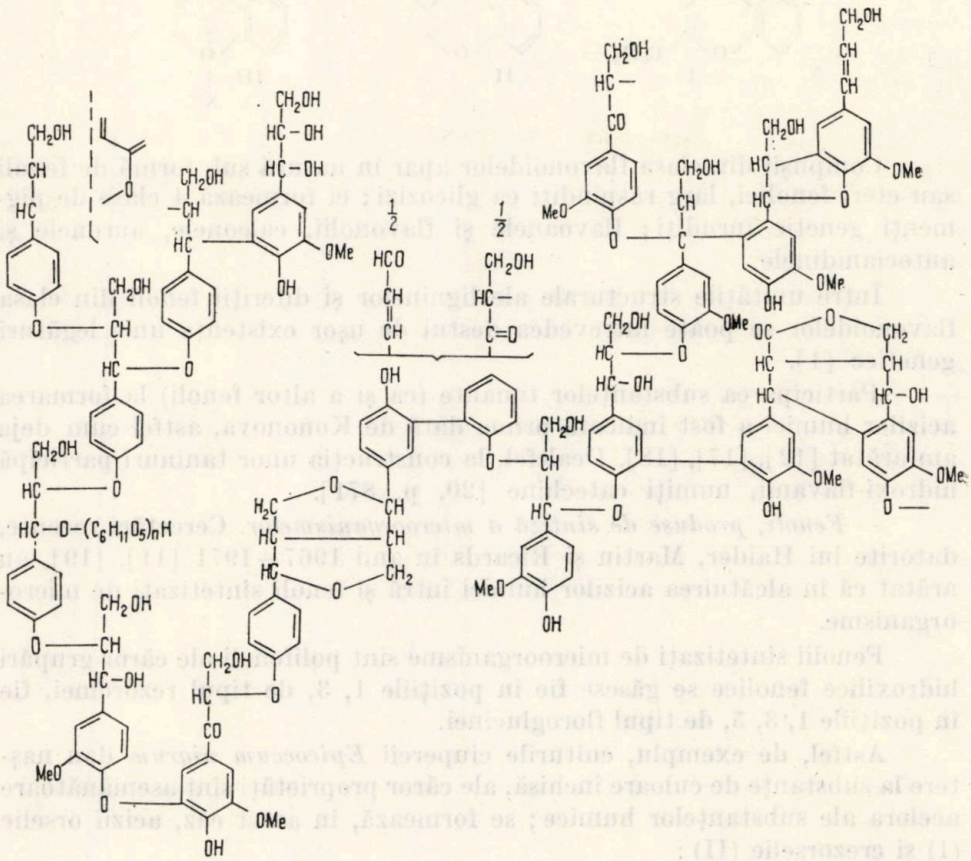
Prin decarboxilarea oxidativă a acidului vanilic sau siringic se formează metoxihidrochinona (I) sau 2,6-dimetoxihidrochinona (II):



I II

Prin demetilare sau după hidroxilare la ortodifenoli, aceste substanţe formează, în prezenţa compuşilor aminici, combinaţii asemănătoare acizilor humici. Aceste combinaţii sînt caracterizate, ca şi substanţele humice, printr-o rezistenţă mai mare la degradare (sub acţiunea microorganismelor) decît celuloza sau proteinele; din această cauză ele se pot acumula în sol.

Structura chimică a ligninei este, după Freudenberg (1968), următoarea :

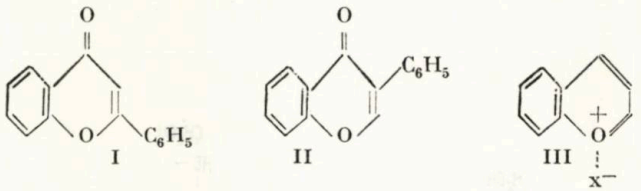


Schema 1. — Monomerul diferitelor lignine (Freudenberg, 1964).

— *Fenoli preexistenţi în materia organică vegetală a solului.* Cercetări referitoare la degradarea reductivă şi oxidativă a acizilor humici, efectuate în anii 1963—1964 de către Burges, Hurst şi Walken, precum şi de Morrison şi Farner [11], [19], au arătat că, în afară de fenolii care formează unităţile structurale ale ligninelor, în alcătuirea acestor acizi humici, intră şi alţi fenoli, cum sînt cei din clasa flavonoidelor, a taninurilor, precum şi unii fenoli sintetizaţi de microorganisme.

În clasa flavonoidelor intră numeroşi derivaţi de la cromonă şi săruri de benzopirilium, care apar în vegetale. O serie de astfel de derivaţi, mult mai răspîndiţi în lumea vegetală, sînt flavonele (I), izoflavonele

(II) şi sărurile de flaviniu (III) :



Compuşii din clasa flavonoidelor apar în natură sub formă de fenoli sau eteri fenolici, larg răspîndiţi ca glicozizi ; ei formează 4 clase de pigmenţi genetic înrudiţi ; flavoanele şi flavonolii, calconele, auronele şi antocianidinele.

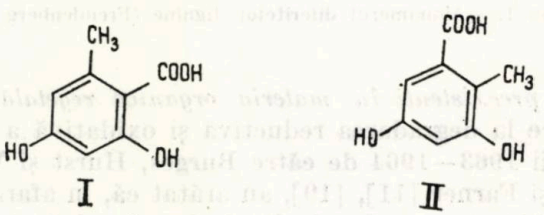
Între unităţile structurale ale ligninelor şi diferiţii fenoli din clasa flavonoidelor se poate întrevedea destul de uşor existenţa unei legături genetice [1].

Participarea substanţelor tanante (ca şi a altor fenoli) la formarea acizilor humici a fost indicată prima dată de Kononova, astfel cum deja am arătat [12], [17], [18]. Dealtfel, la construcţia unor taninuri participă hidroxi-flavanii, numiţi catechine [20, p. 871].

— *Fenoli, produse de sinteză a microorganismelor.* Cercetări recente, datorite lui Haider, Martin şi Ricards în anii 1967—1971 [11], [19], au arătat că în alcătuirea acizilor humici intră şi fenoli sintetizaţi de microorganisme.

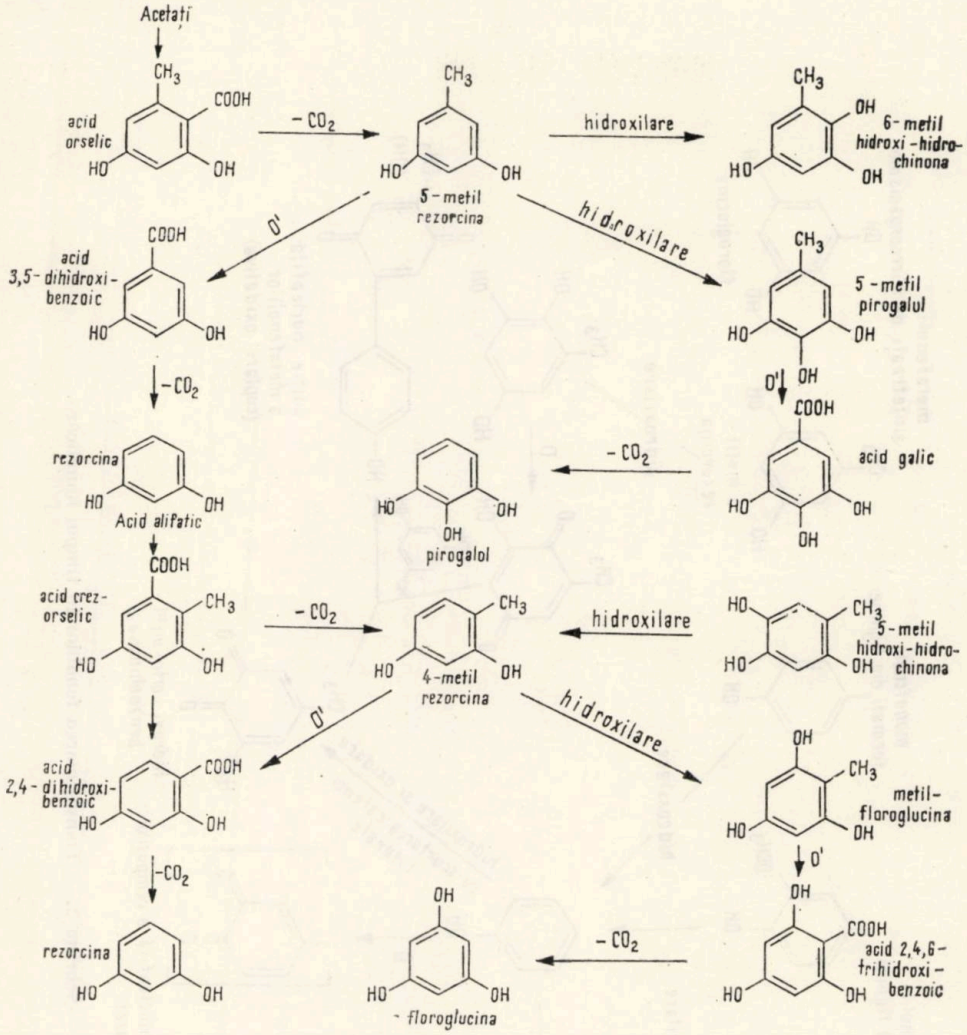
Fenolii sintetizaţi de microorganisme sînt polifenoli ale căror grupări hidroxilice fenolice se găsesc fie în poziţiile 1, 3, de tipul rezorcinei, fie în poziţiile 1, 3, 5, de tipul floroglucinei.

Astfel, de exemplu, culturile ciupercii *Epicoccum nigrum* dau naştere la substanţe de culoare închisă, ale căror proprietăţi sînt asemănătoare acelora ale substanţelor humice ; se formează, în acest caz, acizii orselic (I) şi crezorselic (II) :



Metabolizarea ulterioară a acidului orselic, care se formează pe calea acetatului-malonatului, ca şi aceea a acidului crezorselic, are loc în urma unor procese succesive de decarboxilare, de oxidare a grupării metil, din nou de decarboxilare şi de hidroxilare, care duc pînă la urmă la rezorcină şi pirogalol, respectiv la floroglucină, conform schemei 2, dată

de Haider şi Martin în 1967 :

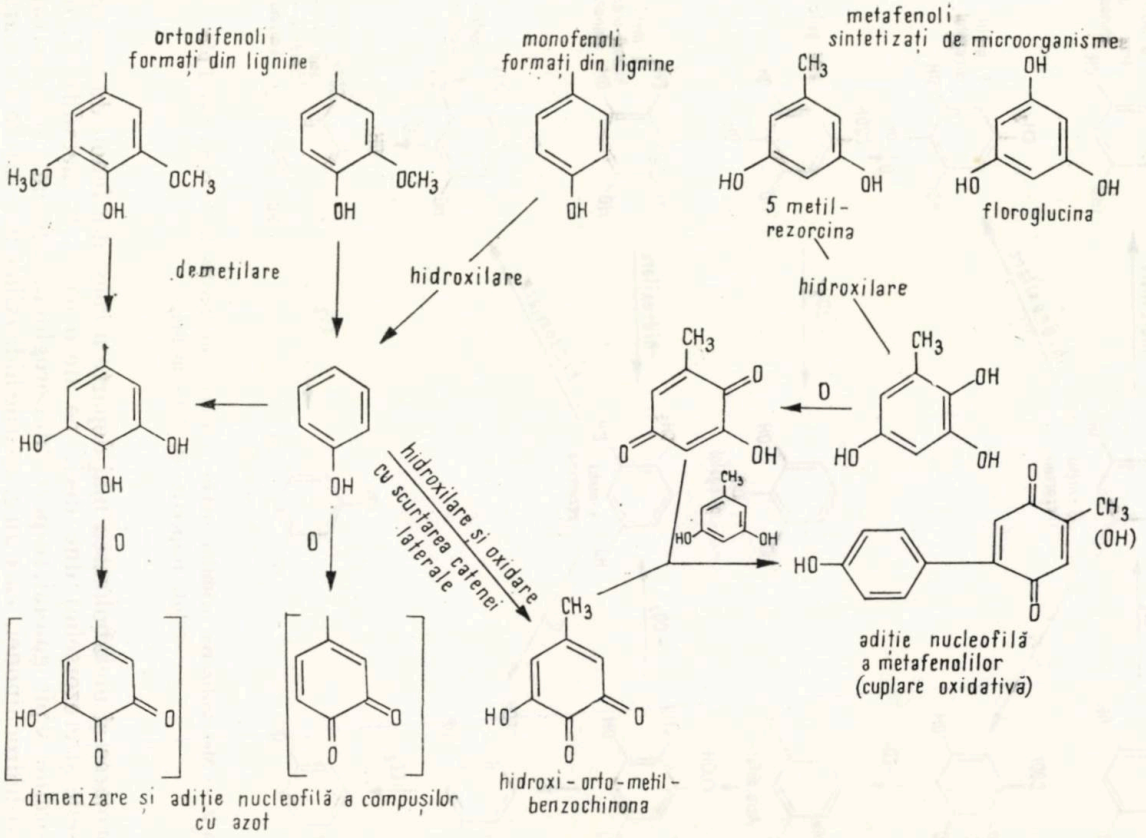


Schema 2. — Metabolizarea acidului orselic şi a acidului crezorselic la rezorcină şi pirogalol, respectiv la floroglucină.

Formarea şi metabolizarea mai departe a celor doi fenoli de mai sus (acid orselic şi crezorselic) duc deci, pe de o parte, la metadifenoli de tipul rezorcinei şi pirogalolui, respectiv al floroglucinei, precum şi la derivaţi ai hidroxi-hidrochinonei, care au grupările hidroxilice în poziţiile o şi para.

Derivaţii hidroxi-hidrochinonei pot fi convertiţi oxidativ în chinone, care adiţionează ulterior nucleofil proteine, aminoacizi sau amoniac, pentru a da naştere la substanţe asemănătoare acizilor humici [19].

Au putut fi puşi în evidenţă şi fenoli care se formează în cursul metabolismului hidraţilor de carbon [19]. Autorii nu arată însă care este natura



Schema 3. — Transformarea fenolilor în timpul humificării.

acestor fenoli în cazul cînd substratul energetic este un zahar, dar desigur că ei sînt perfect asemănători, dacă nu chiar identici cu aceia obţinuţi în cazul cînd substratul a fost un acetat sau un acid alifatic [1].

III. Diferiţii fenoli formaţi în cursul procesului de transformare a materiei organice vegetale sintetizează apoi substanţele humice, prin fixarea azotului pe nucleul lor, în prealabil convertit la chinone [19].

Întregul proces de formare a fenolilor nu reprezintă din punct de vedere fiziologic decît tendinţa pe care o au microorganismele anaerobiotice de a-şi procura energia necesară întreţinerii vieţii. Din această tendinţă de a-şi procura maximum de energie în anaerobioză rezultă atît formarea orto- şi paradifenolilor pe contul unor fenoli mai simpli, cît şi convertirea lor în chinone, a căror formare asigură, totodată, microorganismului şi sistemul enzimatic oxireducător [1].

Procesul enzimatic de adiţie a azotului pe diferiţii fenoli are loc numai în cazul fenolilor care au grupări hidroxilice în poziţia orto sau para, adică numai în cazul acelor fenoli care pot forma chinone [19].

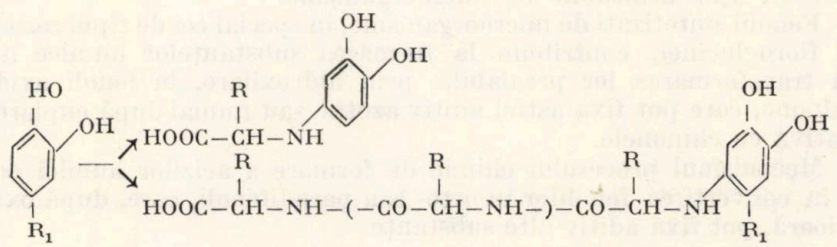
Transformarea fenolilor în chinone în timpul humificării este dată de Flaig în schema 3.

Prin cuplare oxidativă, şi metafenolii se pot fixa nucleofil la benzochinonele formate. Formarea combinaţiilor difenilice prin cuplare oxidativă a metadifenolilor cu bentochinona a fost studiată mai ales de Mausso în 1964 [9].

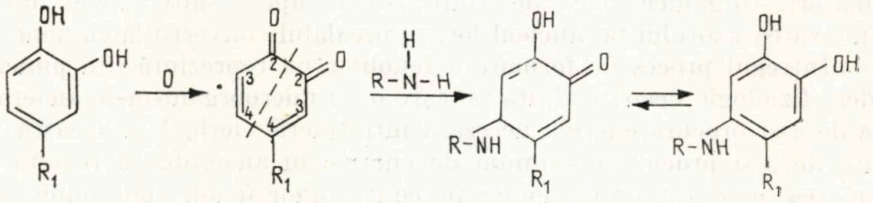
Floroglucina, care este un fenol sintetizat de microorganisme, poate trece şi ea prin hidroxilare în hidroxi-hidrochinonă, participînd astfel la formarea substanţelor humice [19].

Azotul care se fixează pe diferiţii fenoli în procesul de humificare a acestora este de natură aminoacidă, peptidică sau proteinică. Acizii humici formaţi conţin 1—5% azot. Sub acţiunea acidului clorhidric (6N), circa jumătate din conţinutul azotului este hidrolizat sub formă de azot amoniacal (10—25%), de azot aminozaharic (1—5%) şi de azot aminoacid (20—40%), din care cel puţin 7—12% se găseşte ca azot peptidic (Bremner, 1965) [9]. Cît priveşte azotul nehidrolizabil, s-a presupus că el este de natură heterociclică, fapt care nu corespunde adevărului, după cum vom vedea mai jos.

Fixarea azotului are loc prin adiţie nucleofilă de proteine, de peptide şi de aminoacizi la chinonele rezultate din oxidarea prealabilă a orto- şi paradifenolilor :



Mecanismul acestui proces de fixare a azotului poate fi explicat ca un fenomen de adiție a substanțelor cu hidrogen mobil la un sistem de două duble legături conjugate eterogene unde adiția are loc în poziția 1,4 a sistemului [1], adică :



Este ușor de înțeles că fixarea azotului în procesul de formare a acizilor humici nu poate avea loc și în cazul metadifenolilor sau al fenolilor în care o grupare hidroxilică este blocată prin metoxilare, adică în cazul fenolilor care nu pot fi convertiți la chinone.

Modul de legare a proteinelor sau a produselor lor de degradare pe fenoli în timpul oxidării acestora a fost studiat de Haider, Frederick și Flaig în 1965. Acești cercetători au arătat că lanțul proteic sau peptidic legat de fenolul oxidat se poate hidroliza complet, eliminîndu-se sub formă de aminoacizi, în care caz nu rămîne fixat de nucleul fenolic decît un singur aminoacid, și anume acela a cărui grupă aminică a fost fixată direct pe atomul de carbon al nucleului arilic. Numai azotul peptidic este deci hidrolizabil ; azotul aminic este nehidrolizabil. Azotul heterociclic poate fi deci hidrolizabil sau nu, după cum el este de natură amidică sau aminică [1].

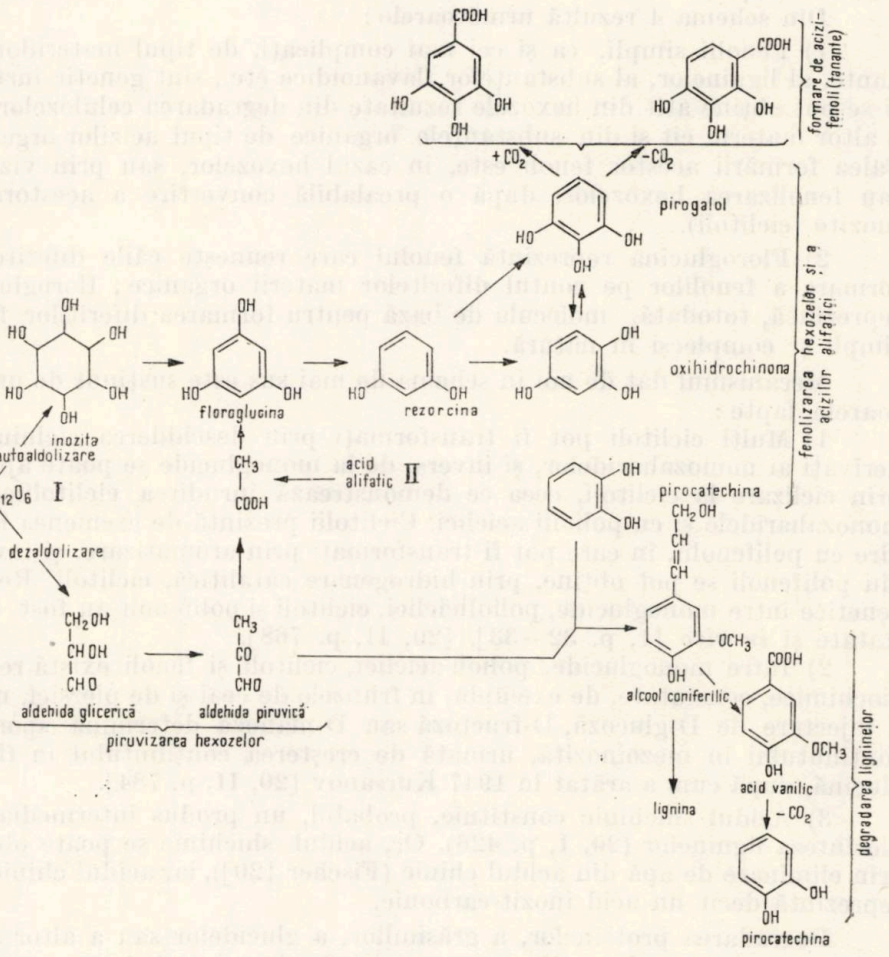
Cercetările efectuate pînă în prezent referitoare la formarea acizilor humici în sol au arătat care este natura substanțelor ce participă la această formare și în ce constă mecanismul acestei formări. S-a stabilit astfel că fenolii rezultați din degradarea ligninelor, precum și aceia sintetizați de microorganisme formează substanțele de bază cu ajutorul cărora iau naștere acizii humici în urma combinării lor cu substanțe aminate de tipul proteinelor peptidelor și al aminoacizilor.

În degradarea ligninelor, rolul principal îl joacă ruperea legăturilor dintre atomii de carbon și demetilarea eterilor fenolici ; în aceste condiții iau naștere produse de degradare mai mari sau mai mici, care participă la formarea substanțelor humice prin fixarea azotului aminic pe nucleul fenolic, prealabil convertit la chinone. Nu se cunoaște însă pînă în prezent în ce măsură produsele de degradare a ligninelor, care formează polimeri, participă la formarea substanțelor humice, deoarece ei reprezintă surse de carbon ușor utilizabile de microorganisme.

Fenolii sintetizați de microorganisme, în special cei de tipul rezorcinei și al floroglucinei, contribuie la formarea substanțelor humice numai după transformarea lor prealabilă, prin hidroxilare, în fenoli oxidabili la chinone, care pot fixa astfel aditiv azotul, sau numai după cuplarea lor oxidativă cu chinonele.

Mecanismul procesului chimic de formare a acizilor humici constă deci în convertirea fenolilor în orto- sau paradifenoli, care, după oxidare ulterioară, pot fixa aditiv alte substanțe.

Compuşii fenolici care provin din degradarea ligninelor sau care sînt sintetizaţi de microorganisme — se găsesc în echilibru în timpul formării substanţelor humice, de unde dispar cînd nucleul lor aromatic este degradat în substanţe alifatice, care sînt folosite ca sursă de carbon în activitatea metabolică a microorganismelor.



Schema 4. — Raporturile genetice ale fenolilor cu substanţele lor generatoare.

În cercetările referitoare la formarea fenolilor prin sinteză microbiană, Flaig arată că fenolii se pot forma nu numai pe contul acizilor alifatici şi al acetaţilor, ci şi pe contul substanţelor hidrocarbonate [19].

Cu excepţia menţiunii făcute de Flaig, nu rezultă din cercetările efectuate pînă acum care este participarea directă a glucidelor şi mai ales a celulozelor din materia organică a solului la construcţia edificiului molecular al fenolilor.

Din cercetările efectuate pînă acum nu rezultă nici mecanismul de formare a fenolilor în sol prin sinteză microbiană. După părerea noastră, acest mecanism — diferit la începutul lui după natura substanţei care se transformă — este unitar, ducînd la floroglucină şi de aici la alţi diferiţi fenoli, aşa cum se poate vedea în schema 4, care indică etapele acestor transformări şi raporturile genetice dintre fenolii formaţi şi substanţele din care iau naştere.

Din schema 4 rezultă următoarele :

1) Fenolii simpli, ca şi cei mai complicaţi, de tipul materiilor tanante, al ligninelor, al substanţelor flavanoidice etc., sînt genetic înrudiţi şi se pot obţine atît din hexozele rezultate din degradarea celulozelor sau a altor materii, cît şi din substanţele organice de tipul acizilor organici. Calea formării acestor fenoli este, în cazul hexozelor, sau prin vizarea sau fenolizarea hexozelor, după o prealabilă convertire a acestora în inozite (ciclitoli).

2) Floroglucina reprezintă fenolul care reuneşte căile diferite de formare a fenolilor pe contul diferitelor materii organice ; floroglucina reprezintă, totodată, molecula de bază pentru formarea diferiţilor fenol simpli şi complecşi în natură.

Mecanismul dat de noi în schema de mai sus este susţinut de următoarele fapte :

1) Mulţi ciclitoli pot fi transformaţi prin deschiderea ciclului în derivaţi ai monozaharidelor, şi invers, de la monoglucide se poate ajunge prin ciclizare la ciclitoli, ceea ce demonstrează înrudirea ciclitolilor cu monozaharidele şi cu poliolii aciclici. Ciclitolii prezintă de asemenea înrudire cu polifenolii, în care pot fi transformaţi prin aromatizare, şi invers, din polifenoli se pot obţine, prin hidrogenare catalitică, ciclitoli. Relaţii genetice între monoglucide, polioliciclici, ciclitoli şi polifenoli au fost constatate şi *in vivo* [1, p. 32—33], [20, II, p. 768].

2) Între monoglucide, polioli aciclici, ciclitoli şi fenoli există relaţii biochimice, constatate, de exemplu, în frunzele de ceai şi de piersici, unde o injectare de D-glucoză, D-fructoză sau D-manoză determină sporirea conţinutului în mezoinozită, urmată de creşterea conţinutului în floroglucină, după cum a arătat în 1947 Kursanov [20, II, p. 784].

3) Acidul shichinic constituie, probabil, un produs intermediar în biosinteza ligninelor (20, I, p. 426). Or, acidul shichinic se poate obţine prin eliminare de apă din acidul chinic (Fischer [20]), iar acidul chinic nu reprezintă decît un acid inozit-carbonic.

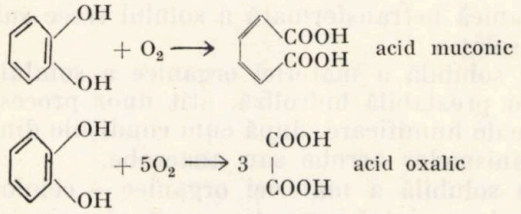
Degradarea proteinelor, a grăsimilor, a glucidelor sau a altor substanţe organice în sol de către microorganisme duce la substanţe care sînt folosite fie direct în sinteza acizilor humici, prin formare prealabilă de substanţe aromatice (mai ales fenoli), fie indirect în procesul de nutriţie şi multiplicare a microorganismelor, care după moarte participă la formarea acizilor humici [9].

Degradarea materiei organice în sol începe mai întîi cu substanţele cele mai uşor hidrolizabile de către microorganisme, şi anume cu glucidele solubile sau cele mai uşor de degradat, cu aminoacizii, cu proteinele şi, parţial, cu celuloza. După aceea este supusă degradării totalitatea celulozelor [2, p. 63], [9, p. 213], apoi a ligninelor şi a acizilor humici formaţi

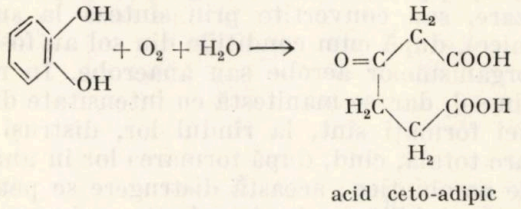
în sol, adică a substanțelor a căror structură ciclică le dă stabilitate mai mare.

Stabilitatea mai mare a substanțelor humice este datorită structurii aromatice și ciclice a moleculei lor (ca și aceea a lignineloor); stabilitatea acestor substanțe este însă limitată. Prin oxidație mai energică pot fi degradate nu numai catenele laterale, dar și nucleul benzenic al unităților structurale care alcătuiesc aceste substanțe.

După cum oxidarea este mai slabă sau mai puternică, substanțele aromatice de tipul pirocatechinei, de exemplu, dau naștere, după Butkevici [9], acidului muconic sau acidului oxalic :

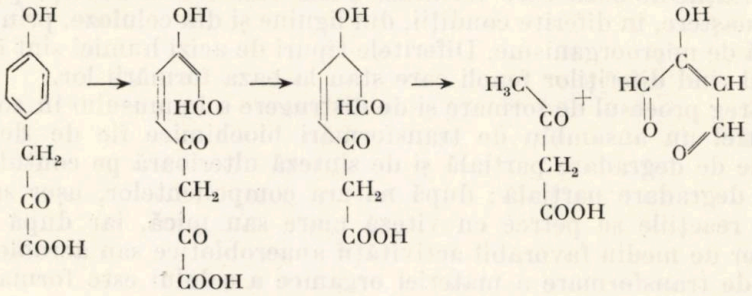


Tot astfel, în alte condiții, Steiner arată că pirocatechina poate fi degradată oxidativ, sub acțiunea microorganismelor, la acid ceto-adipic[9]:



acid ceto-adipic

De asemenea, aminoacizii aromatici de tipul fenilalaninei, tirozinei, triptofanului sînt, probabil, complet oxidați prin distrugerea nucleului arilic [1, p. 394]. Etapele acestei oxidări sînt, în cazul fenilalaninei, tirozina și, apoi, acidul oxifenil piruvic. După Dakin, oxidarea mai departe a acidului oxifenil-piruvic are loc astfel :



Restul nucleului benzenic este și el oxidat mai departe la acid acetilacetic după Dakin sau la acid oxalacetic [1].

Acidul ceto-adipic reprezintă [1] o etapă mai înaintată de oxidare a acidului muconic, etapă care apoi se continuă la acid succinic, acid fu-

maric, acid malic, acid oxalacetic, acid piruvic, acid acetic şi, pînă la urmă, la $CO_2 + H_2O$ [1, p. 395].

Atare comportări ne arată posibilităţile de degradare oxidativă mai înaintată — atît în organismul animal şi vegetal, cît şi sub acţiunea microorganismelor — a substanţelor cu nucleu aromatic, cum sînt ligninele, acizii humici etc.; astfel de posibilităţi pot merge pînă la mineralizarea totală, pînă la combustia completă a substanţelor organice.

CONCLUZII

Materia organică netransformată a solului trece sub acţiunea umidităţii parţial în soluţie.

Partea uşor solubilă a materiei organice a solului este supusă, cu mare viteză, după prealabilă hidroliză, atît unor procese de combustie, cît şi unor procese de humificare, după cum condiţiile din sol permit activitatea microorganismelor aerobe sau anaerobe.

Partea greu solubilă a materiei organice — celuloza, lignina — se îmbibă cu apă, după care intră în reacţie, cu viteză mai mică, degradîndu-se mai întîi, prin hidroliză, la unităţile structurale de bază ale acestor materii greu solubile. Unităţile structurale solubile, rezultate din hidroliză, intră ulterior în reacţie, pentru a fi sau degradate în procese de combustie, pînă la mineralizare, sau convertite prin sinteză la substanţe humice (acizi şi baze humice), după cum condiţiile din sol au fost mai favorabile activităţii microorganismelor aerobe sau anaerobe. În realitate, ambele procese coexistă în sol, dar se manifestă cu intensitate diferită.

Acizii humici formaţi sînt, la rîndul lor, distruşi prin combustie pînă la mineralizare totală, cînd, după formarea lor în anaerobioză, găsesc condiţii favorabile aerobiotice; această distrugere se petrece cu atît mai uşor şi repede cu cît solubilitatea lor în sol este mai mare, cum este cazul acizilor fulvici.

Acizii humici, care reprezintă pînă la 80% din masa totală a substanţelor humice, se descompun deci în sol în mod continuu, în măsura în care ei se formează, constituind astfel, în sol, în primul rînd o sursă azotată pentru nutriţia plantelor.

Unităţile de bază care formează acizii humici sînt diferiţii polifenoli care iau naştere, în diferite condiţii, din lignine şi din celuloze, prin sinteză efectuată de microorganisme. Diferitele tipuri de acizi humici sînt datorite în primul rînd diferiţilor fenoli care stau la baza formării lor.

Întreg procesul de formare şi de distrugere a humusului în sol reprezintă astfel un ansamblu de transformări biochimice fie de degradare totală, fie de degradare parţială şi de sinteză ulterioară pe contul produselor de degradare parţială; după natura componentelor, uşor sau greu solubile, reacţiile se petrec cu viteză mare sau mică, iar după natura condiţiilor de mediu favorabil activităţii anaerobiotice sau aerobiotice —, direcţia de transformare a materiei organice a solului este formarea sau descompunerea humusului.

Prezentat la redacţie la 12 februarie 1973

Institutul agronomic „N. Bălcescu", Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. M. Ionescu, *Biochimia agricolă*, Edit. Ceres, Bucureşti, 1970.
2. M. V. Fedorov, *Microbiologia solului*, Edit. agrosilvică, Bucureşti, 1957.
3. F. Soare, *Microbiologia solului*, Edit. didactică şi pedagogică, Bucureşti, 1966.
4. G. André, *Chimie du sol*, J. B. Baillière, Paris, 1930.
5. V. R. Viliams, *Pocivovedenie*, Selhozghiz, 1947.
6. V. R. Viliams, *Pedologie*, Edit. agrosilvică, Bucureşti, 1954.
7. C. N. Oprea, *Pedologia agricolă*, Edit. agrosilvică, Bucureşti, 1960.
8. L. V. Tiurin, *Problemî sovetskogo pocivovedenia*, Sbornic 2, 1936.
9. La V. Peive, *Biohimia pociv Gorud*, Izd. s-h. literaturî jurnalov i plakotov, Moskva, 1961.
10. V. V. Ponomareva, Jurn. pocivovedenie, **12**, 18 (1947).
11. W. Flaig, Soil Sci., **111**, 19 (1971).
12. L. V. Tiurin, *Geograficeskie zakonomeinosti gumusoobrazovariiia*, Trudî iubileinoi sessii, posvacionnoi loo-letiiu so dnea rojdeniia V. V. Dokuceaeva, Izd. AN. SSSR, 1949.
13. C. Bodea, *Chimia solului*, Edit. politehnicii, Timişoara 1945.
14. S. A. Waksmann, *Gumus, proishojdenie, himiceskii sostav i znacenie ego v prirode*, Selhozghiz, 1936.
15. S. S. Dragunov, i sotr., Jurn. Pocivovedenie, **3**, 26 (1950).
16. G V. Trusov, Journal opîtnoi agronomii, **17**, 11 (1916).
17. M. M. Kononova, I. V. Aleksandrova, Izvestiia AN. S.S.S.R. Seriia biologhi ceskaia, **1**, 16 (1957).
18. M. M. Kononova, Microbiologhiia, **18**, 2 (1949).
19. W. Flaig, *Neue Ergebnisse über Bildung und Chemie von Huminstoffen*. Conferinţă ţinută în 1972 la Academia de Ştiinţe Agricole (sub tipar la CIDAS), Bucureşti.
20. C. Bodea, *Biochimia vegetală*, vol. I şi II, Edit. Academiei, Bucureşti, 1964 şi 1965.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 3, 337–343 (1973)

RECENZII

Methods in immunology and immunochemistry, vol. III. *Reactions of antibodies with soluble antigens* (Metode în imunologie şi imunochimie, vol. III. Reacţii ale anticorpilor cu antigene solubile), Edit. C. A. Williams şi M. W. Chase, Academic Press, New York — London, 1971, 515 p.

Lucrarea de faţă face parte din seria de volume, publicate sau în curs de publicare, privind metodele de lucru cele mai folosite în imunologie şi imunochimie. Însuşi titlul lucrării o recomandă ca pe o carte de laborator indispensabilă oricărui cercetător preocupat de probleme de imunologie şi imunochimie.

Cartea este împărţită în trei capitole, şi anume : 1) reacţii de precipitare, 2) reacţii de precipitare în medii gelificate şi 3) reacţii ale haptenelor cu anticorpii complementari.

În primul capitol sînt descrise metodele folosite pentru studierea reacţiilor de precipitare, şi anume : reacţia de precipitare cantitativă, inhibarea reacţiei de precipitare, precipitarea cu sulfat de amoniu a complexelor antigen-anticorp solubile, analiza turbidimetrică a reacţiilor de precipitare şi determinarea concentraţiei antigenului în amestecuri complexe, prin măsurarea densităţii optice a suspensiilor turbide.

Al doilea capitol este dedicat reacţiilor antigen-anticorp în medii gelificate. Sînt descrise pe larg tehnicile de simplă şi dublă difuzie şi cele imunoelectroforetice, care permit caracterizarea sistemelor antigen-anticorp atit din punct de vedere calitativ, cît şi cantitativ.

Ultimul capitol este dedicat reacţiilor dintre haptene şi anticorpi. Sînt descrise în detaliu atit tehnicile pentru determinarea constantelor de echilibru ale reacţiilor, prin metoda echilibrului de dializă şi stingerea fluorescenţei, cît şi cele pentru determinarea constantelor cinetice şi termodinamice.

Cartea cuprinde şi o anexă privitoare la identificarea anticorpilor prin radioimunoelectroforeză şi radioimunodifuzie.

Prin claritatea stilului, bogăţia detaliilor tehnice, dar şi prin consideraţiile teoretice pe care le cuprinde, această lucrare se recomandă prin ea însăşi celor interesaţi să-şi însuşească metodele imunochimice bazate pe reacţia antigen-anticorp.

Doina Onică
Institutul de ştiinţe biologice
Departamentul de biochimie
Bucureşti

Enzymes and isoenzymes. Structure, properties and function (Enzime şi izoenzime. Structură, proprietăţi şi funcţie), vol. 18, FEBS, Proceedings of the Fifth Meeting, Prague, July 1968, Editor D. Shugar, Academic Press, London — New York, 1970, 361 p.

Acest volum conţine 35 de lucrări a două simpozioane ţinute în cadrul celui de-al cincilea miting anual al Federaţiei societăţilor europene de biochimie.

În primele 10 lucrări, care au format obiectul Simpozionului „Relații între structură și activitatea enzimatică", sînt abordate o serie de aspecte moderne ale enzimologiei, ca, de exemplu: structura primară și activitatea gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazei și importanța localizării resturilor de tirozină pe suprafața sau în interiorul moleculei proteice; grupările sulfhidril ale centrului activ al alcool dehidrogenazei din drojdie și aldolazei din mușchiul de iepure; activitatea triptică la nevertebrate; studii de secvență la pepsina de porc; aspecte topochimice ale aspartat transaminazei și despre centrul activ al aspartat aminotransferazei.

Principalele aspecte din următoarele 25 de lucrări, cuprinse în Simpozionul „Izoenzime, proprietăți, structură și funcții", sînt: studii de structură, activitate, mecanism de inactivare la căldură și aspectul electroforetic al LDH și izoenzimelor sale; izoenzimele alcool dehidrogenazei și malat dehidrogenazei în țesuturi; schimbări în activitatea și aspectul electroforetic al enzimelor și izoenzimelor glicolitice; studii asupra fosfatazei alcaline și fosfohidrolazei; proprietățile biochimice și imunologice ale β-galactozidazelor, izoenzimelor creatinkinazei, monoaminooxidazei, catalazei și evoluția și modificările patologice ale unor izoenzime.

Articolele sînt semnate de nume cunoscute, ca: J. I. Harris, M. Davidson, N. Evans (Anglia); F. B. Straub, P. Elödi (R.P. Ungară); S. Maroux, F. Schapira, L. Pasero (Franța); H. G. Heidrich, R. Zwiling, G. Pfleiderer (R. F. Germania); V. Kostka, Z. Masek, V. Hule (R. S. Cehoslovacă); J. C. Clausen (Danemarca); A. N. Braunstein (U.R.S.S.); D. W. Moss (Scoția).

Volumul aduce numeroase date noi și prezintă un bogat material ilustrativ și bibliografic.

Natalia Moldoveanu
Institutul de științe biologice
Departamentul de biochimie
București

SABINA LAETITIA KOWALEWSKI, *Die Isoenzyme der Lactatdehydrogenase* (Izoenzimele lactatdehidrogenazei), din seria „Biochemie und Klinik, Monographien in zwangloser Folge"; editori G. Weitzel și N. Zöllner, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1972, 156 p., 19 fig., 49 tab.

Monografia de față, îndreptar prețios pentru biochimiști, mai ales pentru cei ce lucrează în laboratorul clinic, este o dovadă a dezvoltării și a aprofundării cunoștințelor noastre asupra polimorfismului molecular al lactatdehidrogenazei (LDH) și a modului cum aceste cunoștințe sînt aplicate în diagnosticul clinic.

Cartea este prefațată de prof. dr. H. Hungerland, colaborator al autoarei. După o scurtă introducere în problematica volumului, materialul prezentat este grupat în următoarele capitole:

Primul capitol, intitulat „Biochimia și biologia izoenzimelor LDH", cuprinde, alături de istoricul, nomenclatura și structura izoenzimelor LDH, date interesante asupra izoenzimelor LDH în dezvoltarea ontogenetică, cercetări genetice asupra acestor izoenzime, precum și cîteva modele electroforetice de izoenzime LDH tisulare.

Cel de-al doilea capitol, „Metode de determinare", cuprinde principalele metode electroforetice (în bloc de amidon, în gel de amidon, în gel de agar, în gel de acrilamidă și pe acetat de celuloză), cromatografice și imunologice de evidențiere a formelor moleculare ale izoenzimelor LDH. Un paragraf aparte este rezervat prezentării metodei de electroforeză în gel de agar, folosită în diagnosticul clinic.

În capitolul al 3-lea sînt prezentate fiziologia și patologia izoenzimelor LDH. Este discutat aici modelul izoenzimelor LDH din organe de fetus, nou-născut și adult, precum și modelul seric al izoenzimelor LDH în aceste etape de dezvoltare. Un loc important îl ocupă modelul izoenzimelor LDH din organele și din serul uman, în diferite boli (de inimă, de ficat, de rinichi, hematologice, neuromusculare, boli din timpul perioadei de sarcină, în cancer etc.).

În sfîrșit, în ultimul capitol este discutată importanța izoenzimelor LDH pentru biochimie și clinică.

Modul sistematizat și concis de prezentare a cercetărilor — deosebit de numeroase în ultimii ani — asupra izoenzimelor LDH este completat prin prezentarea — pe capitole — a indicațiilor bibliografice, cuprinzînd și titlurile lucrărilor. Volumul este întregit de un index de subiecte și o listă de prescurtări.

Doina Popov,
Centrul de biostructură
București

Oncogenesis and herpesviruses (Oncogeneză și virusuri herpetice), Ed. P. M. Biggs, G. de Thé, L. N. Payne, International Agency for Research on Cancer (IARC), Scientific Publication No. 2, Lyon, 1972, 515 p.

Rolul factorilor de mediu ca agenți cauzali în cancerul uman este astăzi considerat a fi mult mai important decît se credea în trecut. În ultimii ani a fost studiat intens rolul posibil al virusurilor în cancer; în speranța de a aprofunda cunoașterea acestei probleme, Agenția internațională de cercetare a cancerului (IARC) a organizat un simpozion pentru a compara și a discuta diverse aspecte ale bolilor umane și animale, despre care se știe că sînt asociate cu virusurile herpetice; acest simpozion s-a ținut la Cambridge (Anglia) între 20 și 25 iunie 1971.

Pentru studiu au fost selecționate trei maladii umane — limfomul Burkitt, mononucleoza infecțioasă, carcinomul nasofaringian — și două animale — boala lui Marek a păsărilor domestice și carcinomul renal Lucké la broaște.

Lucrările simpozionului au debutat cu un referat despre trăsăturile biochimice ale celulelor infectate cu virusuri herpetice, în special în legătură cu potențialul lor oncogen; în continuare, atît referatele, cît și lucrările originale, au fost axate pe patologia, virusologia și epidemiologia maladiilor menționate anterior.

S-au prezentat de asemenea o serie de lucrări despre alte virusuri herpetice asociate cu neoplasme, despre relația dintre virusurile oncogene și alte virusuri herpetice, dîndu-se și o clasificare a virusurilor herpetice.

În încheierea lucrărilor, prof. G. Klein a prezentat o apreciere critică a întregului simpozion, arătînd că acesta a contribuit la cunoașterea mai amănunțită a rolului virusurilor în cancerul uman.

La sfîrșitul fiecărui grup de lucrări este publicat rezumatul discuțiilor.

Gabriela Romalo,
Institutul oncologic
București

Modern inhalation anesthetics (Anestezice moderne de inhalaţie), ed. Maynard B. Chenoweth, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1972, 591 p., 90 fig.

Această monografie reprezintă volumul XXX al seriei *Handbook of Experimental Pharmacology* (*Manual de farmacologie experimentală*) şi conţine o expunere sistematică a farmacologiei anestezicelor moderne. La realizarea volumului au participat numeroşi autori, binecunoscuţi în domeniul anesteziei şi farmacologiei.

Prima parte a lucrării se ocupă de chimia anestezicelor de inhalaţie; se prezintă metode de sinteză şi proprietăţile fizico-chimice ale halotrenului, metoxifluranului, fluroxenului, tefluranului şi refluranului. Cea mai mare parte a volumului este consacrată studiului aspectelor clinice ale acestor derivaţi şi acţiunii lor comparative asupra unor sisteme vitale: sistemul nervos central, circulator, respirator, endocrin, tractul gastrointestinal, ficatul şi rinichii. Absorbţia, distribuţia şi excreţia anestezicelor sînt discutate în termeni de cinetică şi biotransformare; mecanismul de acţiune este privit atît din punct de vedere al aspectelor moleculare, cît şi al celor neurofiziologice. Se prezintă, de asemenea, o serie de date experimentale referitoare la acţiuni comparative ale anesteziei la animale. Cum anestezicele se utilizează în general concomitent cu alte medicamente, un capitol special este consacrat interacţiunii anestezice — medicamente, aceasta putînd fi cauza unor efecte farmacologice neaşteptate, toxice sau terapeutice.

Impurităţile care apar în timpul preparării sau depozitării anestezicelor constituie de asemenea o preocupare importantă a firmelor producătoare; din această cauză se prezintă date despre unele impurităţi mai toxice, şi anume: hidrocarburile, eterii, derivaţii halogenaţi şi oxidul de azot.

Monografia prezintă un interes deosebit pentru anestezişti, farmacologi, chimişti şi biochimişti; conţine o bogată bibliografie, prezentată la sfîrşitul fiecărui capitol, precum şi un index de autori şi unul de subiecte.

Gabriela Romalo,
Institutul oncologic
Bucureşti

Hypertension (Hipertensiunea), ed. J. Genest şi E. Koiw, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1972, 617 p., 304 fig.

Volumul cuprinde lucrările Simpozionului de hipertensiune, organizat în 1972 de către Institutul de cercetări clinice din Montreal.

Cea mai mare parte a lucrărilor se ocupă în special de problema secreţiei reninei, şi anume de efectul activităţii simpatice şi ACTH-ului asupra secreţiei reninei, de mecanismul secreţiei crescute de renină asociată cu adrenalectomia, de compararea efectului diferitelor catecolamine asupra activităţii reninei plasmatice, de studiul sistemului renină-angiotensină etc.

O altă grupă de lucrări este axată pe problema reninei la pacienţi cu hipertensiune; se analizează răspunsul paradoxal al activităţii reninei plasmatice la variaţii ale încorporării sodiului, relaţia dintre sistemul nervos adrenergic şi renină în hipertensiunea labilă hipercinetică, acţiunea stimulatorie a diferitelor medicamente asupra activităţii reninei plasmatice.

A fost de asemenea discutată structura chimică a reninei; s-au prezentat lucrări despre formele multiple ale reninei renale umane, despre natura acestei renine și altele.

Principalele aspecte biochimice trecute în revistă au fost: rolul cationilor și ATP-ului asupra activității proteinei contractile din artere, efectul angiotensinei II asupra sintezei de ADN, ARN și proteine, aspecte ale metabolismului hormonilor și electroliților în hipertensiune. Numeroase lucrări se ocupă de aspectele endocrinologice ale hipertensiunii, în special de rolul aldosteronului.

Problema angiotensinei I și a enzimei care o transformă în angiotensină II a constituit subiectul mai multor comunicări în care s-a analizat un nou sistem de acest tip, locul și mecanismul acestei transformări, studiul enzimei din diferite țesuturi, ca și factorii inhibitori, utilizarea clinică a receptorilor de angiotensină, determinarea radioimună a angiotensinei I, II și a sistemului renină-angiotensină.

Dintre problemele mai importante discutate se mai remarcă de asemenea cele referitoare la hipertensiunea mineralocorticoidă, diverși factori implicați în etiologia și prognoza hipertensiunii esențiale, hipertensiuneă experimentală benignă și malignă.

Simpozionul prezintă un mare interes atît pentru experimentatori, cît și pentru clinicieni, mai ales că abordează o serie de probleme foarte noi, care au putut fi studiate numai datorită elaborării unor tehnici adecvate, fapt petrecut în ultimii ani; au fost prezentate 64 de lucrări, iar la sfîrșitul fiecărui grup este publicat rezumatul discuțiilor. Volumul conține un index de autori și unul de subiecte.

Gabriela Romalo,
Institutul oncologic
București

E. KRAUS. *Immunophthalmologische Untersuchungen mit Hetero- und Autoantiseren* (Cercetări imunoftalmologice cu etero- și autoantiseruri), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1972, 53 p., 40 fig., 9 scheme, 8 tabele.

Această monografie constituie al 25-lea caiet al seriei *Normale und Pathologische Anatomie* (*Anatomie normală și patologică*), care apare sub redacția lui W. Bargmann și W. Doerr.

Autoimunopatogeneza bolilor de ochi este o problemă viu discutată, de mulți ani; volumul de față se ocupă de studiul oftalmiei simpatice, care s-a dovedit a fi și ea o maladie autoimună. Datele experimentale și clinice expuse în lucrare sînt rezultatul colaborării strînse dintre o grupă de specialiști imunologi și alta de oftalmologi.

Printre problemele mai importante examinate în monografie se remarcă cea a verificării regulii imunologice conform căreia, după o imunizare heterologă cu majoritatea țesuturilor, anticorpii sînt orientați în special față de antigenii specie-specifici, și nu față de cei cu specificitate de organ. De asemenea, s-a urmărit dacă printr-o sensibilizare „autogenă" se pot obține modificări inflamatorii ale ochiului. Serurile animalelor astfel sensibilizate sînt aplicate apoi pe orbita și corneea animalelor de aceeași linie.

Monografia este importantă pentru studiul etiogeniei și patogenezei oftalmiei simpatice; ea este utilă atît pentru cercetarea experimentală, cît și pentru cea clinică.

Gabriela Romalo,
Institutul oncologic
București

J. LADIK, *Quantenbiochemie für Chemiker und Biologen* (Biochimie cuantică pentru chimiști și biologi), Edit. Akademiai Kiadó, Budapesta, 1972, 252 p., 111 fig., 11 tabele.

Cu toate că biochimia cuantică este o ramură relativ nouă a științelor biologice, cercetările de mecanică cuantică aplicate la studiul structurii electronice a macromoleculelor biologic active au dus deja la o serie de rezultate extrem de interesante, fapt demonstrat și de prezenta carte. După ce autorul prezintă la început bazele mecanicii cuantice și metodele ei specifice de cercetare, el analizează în capitolele următoare rezultatele obținute la cercetarea structurii electronice a acidului dezoxiribonucleic (ADN). Înainte de a trece la explicarea rolului și proprietăților fizice și biologice ale ADN, autorul descrie structura chimică și spațială, precum și proprietățile de semiconductor ale ADN. Un capitol este dedicat acțiunii exercitate asupra structurii electronice a ADN de către diferitele radiații care pot influența scindarea acestuia și apariția de mutații. Un alt capitol este consacrat cercetării structurii electronice a proteinelor și proprietăților lor de semiconductori, insistîndu-se mai ales asupra modului în care aceste proprietăți determină rolul biologic al proteinelor. În continuare sînt prezentate datele obținute la studiul structurilor electronice ale hidrocarburilor cancerigene și relațiile care există între aceste structuri și proprietățile cancerigene. Se demonstrează într-un capitol special modul de acțiune al substanțelor cancerigene, schițîndu-se o teorie unitară a genezei cancerului. Penultimul capitol se ocupă cu structurile electronice ale moleculelor participante la fotosinteză și cuprinde o serie de considerații asupra mecanismelor lor de acțiune. În fine, un ultim capitol este rezervat perspectivelor pe care le deschide această ramură modernă a biochimiei, mai ales pentru rezolvarea unor probleme legate de genetică, gerontologie sau chiar pentru sinteza dirijată a produselor farmacologic active.

Cartea și-a propus să arate cititorului interesat de diferite aspecte legate de biologia modernă cîte probleme fundamentale ale biologiei pot fi interpretate pe baza biochimiei cuantice și încheie cu un index bibliografic (123 de referințe) și un index alfabetic pe subiecte.

Horst D. Schell,
Institutul de științe biologice
Departamentul de biochimie
București

G. KRAFT, J. FISCHER, *Indikation von Titrationen* (Indicarea punctului de echivalență la titrări), Edit. Walter de Gruyter, Berlin — New York, 1972, 300 p., 124 fig.

Prezenta carte face parte din seria *Metode moderne de lucru ale științelor naturii*, editată de prof. dr. K. Fischbeck și este consacrată metodelor volumetrice de analiză. Autorii trec în revistă procedeele folosite în prezent pentru determinarea punctului de echivalență la titrări volumetrice, analizînd critic și cu multă competență fiecare metodă în parte. Valoarea cărții care se adresează tuturor chimiștilor analiticieni constă nu numai în expunerea principiilor de funcționare și a bazelor teoretice ale metodelor respective, dar și în prețioasele indicații privitoare la domeniile de aplicare și la efectuarea practică a determinărilor. Astfel, în cele opt capitole ale cărții sînt prezentate, rînd pe rînd, metodele optice, radiometrice, termometrice, potențiometrice, voltametrice, amperometrice, conductometrice și oscilometrice de determinare a punctului de echivalență. Numeroase curbe de titrări, tabele și scheme de circuite

şi instalaţii întregesc în mod util, pe lîngă cele peste 400 de indicaţii bibliografice, materialul prezentat.

Horst D. Schell,
Institutul de ştiinţe biologice
Departamentul de biochimie
Bucureşti

Logarithmische Rechentafeln für Chemiker, Pharmazeuten, Mediziner und Physiker, begründet von F. W. Küster, fortgeführt von A. Thiel, neubearbeitet von K. Fischbeck (Tabele logaritmice pentru chimişti, farmacişti, medici şi fizicieni), ed. a 101-a, îmbunătăţită şi lărgită, Editura Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1972, 310 p.

Prezenta culegere cuprinde o serie de tabele, constante şi formule chimice şi matematice utile chimiştilor, în activitatea lor de zi cu zi. Un prim capitol prezintă greutăţile atomice şi moleculare, cu valorile lor logaritmice, la care s-a ţinut seama de datele din 1970, publicate de Comisia pentru greutăţi atomice a Uniunii internaţionale de chimie pură şi aplicată. Capitolul 2 este consacrat echivalenţilor soluţiilor titrate şi logaritmilor lor folosiţi în chimia analitică la analize volumetrice. Factorii stoechiometrici sînt daţi în capitolul 3, iar calcularea corecţiilor la volume de gaze în capitolul 4. Metodele de determinare a greutăţii moleculare (dintre care amintim metoda ebulioscopică şi cea crioscopică), cu constantele necesare pentru aceste determinări sînt prezentate în capitolul 5. Capitolul 6 cuprinde datele necesare pentru determinările picnometrice, iar capitolul 7 date privitoare la densitatea, refracţia şi solubilitatea unor compuşi importanţi şi des întîlniţi în laboratoarele de chimie. Probleme legate de electrochimie (puntea Wheatstone, echivalenţi electrochimici, elemente normale, determinarea de pH, amestecuri de soluţii tampon şi altele) sînt tratate în capitolul 8. Capitolul 9 este dedicat în întregime indicatorilor pentru determinarea pH-ului, iar capitolul 10 termochimiei (scale de temperaturi, tabele de transformare a gradelor Fahrenheit în grade Celsius, şi invers, corecţii la termometre cu mercur şi ale punctelor de fierbere ş.a.). Capitolul 11 cuprinde semnele de notare a diferitelor constante şi unităţi de măsură folosite în termodinamică, mecanică, electricitate, magnetism, optică etc. Acest capitol cuprinde, de asemenea, şi indicaţii legate de nomenclatura combinaţiilor anorganice şi organice (denumirea ionilor şi radicalilor, numerotarea atomilor de carbon din molecula compuşilor organici ciclici), alfabetul grecesc, tabele de transformare a unităţilor de măsură engleze în unităţi metrice etc. Metodele şi procedeele de calcul folosite la calcularea erorilor, la regula amestecurilor, la rezolvarea ecuaţiilor de gradul doi şi trei ş.a. sînt expuse în capitolul 13. Evaluarea radiografiilor obţinute cu raze Röntgen pentru determinarea structurilor cristaline face obiectul capitolului 14. Ultimele două capitole cuprind tabele legate de difuzie şi fotometrie.

Această utilă culegere se încheie cu o serie de explicaţii amănunţite, legate de înţelegerea şi aplicarea practică a tuturor formulelor şi metodelor amintite în carte, cu tabelele mantiselor logaritmilor zecimali de la toate numerele cuprinse între 1 000 şi 9 999 şi un index alfabetic pe subiecte.

Horst D. Schell,
Institutul de ştiinţe biologice
Departamentul de biochimie
Bucureşti

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca: *Viaţa ştiinţifică*, în care prin note scurte sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei: congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc., *Recenzii*, în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie: str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 63, sectorul 1.

1973 SEP 27

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

M. ŞERBAN şi D. COTARIU, **Biochimia contracţiei musculare**, 1970, 240 p., 20,50 lei.

I. DICULESCU, DOINA ONICESCU şi LETIŢIA MISCHIU, **Biologie celulară**, 1971, 420 p., 36 lei.

N. SĂLĂGEANU, **Fotosinteza**, 1972, 243 p., 5 pl., 13 lei.

V. D. MÂRZA şi H. ARAŢEI, **Biomorfologia corticalei ovariene la mamifere**, 1972, 180 p., 2 pl., 8 lei.

P. RAICU, M. IONESCU-VARO, G. GANCEVICI şi GABRIELA MOISESCU, **Celula. Structură, ultrastructură şi funcţii**, 1972, 344 p., 12 pl., 26 lei.

EUGEN MACOVSCHI, **Natura şi structura materiei vii**, 1972, 184 p., 4 pl., 15 lei.

I. V. DACIUC, **Reglarea celulară a metabolismului glucozei şi acizilor graşi**, 1973, 255 p., 10,50 lei.

La revue „Studii şi cercetări de biochimie" parait 4 fois par an. Le prix d'un abonnement annuel est de $ 5—. Toute commande à l'étranger sera adressée à Întreprinderea Rompresfilatelia, Boîte postale 2001, telex 011631, Bucarest, Roumanie, ou à ses représentants à l'étranger. En Roumanie, vous pourrez vous abonner par les bureaux de poste ou chez votre facteur.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 16, NR. 3, P. 231—344, BUCUREŞTI, SEPTEMBRIE, 1973

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ BUCUREŞTI

I.P. „Informaţia" — c. 3022

43816

Lei 20.-

F1330

studii și cercetări de biochimie

4

TOMUL 16

1973

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 16, nr. 4, p. 345–450, București, decembrie 1973

SCBIAS — 16 (4), 345–450 (1973)

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

Academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacție:

VICTOR GHEȚIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 80 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții. Revista se poate procura (direct sau prin poștă) și prin PUNCTUL DE DESFACERE din cadrul EDITURII ACADEMIEI.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se face prin Întreprinderea Rompresfilatelia, Căsuța poștală 2001 — telex 011631, București, România, sau prin reprezentanții săi din străinătate.

Manuscrisele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență, se vor trimite pe adresa Comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie", București, str. Docenților nr. 20, sectorul 1.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
București, str. Gutenberg nr. 3 bis, sectorul 6

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
BIOCHIMIE

Tomul 16, nr. 4 1973

ORSZÁGOS MŰSZAKI KÖNYVTÁR ÉS MÚZEUM

SUMAR

E. MACOVSCHI, Bazele filozofice ale concepţiei biostructurale 349

A. CIOLAC-RUSSU, Activitatea fosfatazelor acide şi alcaline la stafilococii sensibili şi la cei rezistenţi la unele antibiotice 357

F. ENACHE, C. POPPA, Mecanismele de reacţie ale procesului de coagulare a plasmei sanguine 363

I. HAGIMA, Separarea cromatografică şi electrofocalizarea izoperoxidazelor din frunzele de porumb 371

O. MACARIE, Activitatea unor enzime serice la şobolanii masculi cu sindrom litiazic renal indus prin etilenglicol 377

Z. MARCU, I. BRAD, T. PÎRVU, Studiul comparativ al izoenzimelor peroxidazice din seminţe de la genurile *Aegilops* şi *Triticum* 383

C. MEDEŞAN, N. MOLDOVEANU, TR. RĂDULESCU, Variaţia nivelului acidului lactic şi a activităţii lactat-dehidrogenazei din muşchi după perfuzia acestora cu soluţii suplimentate cu ioni de K^+, Ca^{2+} şi Mg^{2+} 391

EUG. PĂUNESCU, Program etapizat de aplicare a controlului de calitate în laboratoarele de chimie clinică 399

H. POPESCU, C. OPFERMANN, V. POP, Variaţii în compoziţia chimică a uleiului volatil din fructe de *Amorpha fruticosa* L. 407

L. SCOLNIC, Influenţa ionului de cesiu asupra conţinutului în acid lactic şi apă totală şi asupra exosmoz i acidului lactic din muşchiul gastrocnemian de broască 411

M. ŞERBAN, M. ŞERBAN, Corelaţii între diferite căi ale metabolismului glucidic în condiţiile inhibiţiei metabolice cu malonat 419

M. ŞERBAN, D. COTARIU, G. DĂNICEL, C. IORDACHE, N. MOLDOVEANU, C. MEDEŞAN, T. BENŢIA, Contribuţii la caracterizarea biochimică a muşchiului de porc cu miopatie exsudativă 429

REFERAT GENERAL

C. MOTAŞ, Relaţii intracelulare între microeterogenitatea unor enzime şi sistemele proteolitice 437

RECENZII 445

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

Tome 16, no. 4 1973

C O N T E N T S

E. MACOVSCHI, Philosophical bases of the biostructural conception 349

A. CIOLAC-RUSSU, Comparative study of the acid and alkaline phosphomonoesterases of sensitive and drug resistant staphylococci 357

F. ENACHE, C. POPPA, The reaction mechanism of the plasma coagulation process 363

I. HAGIMA, Chromatographycal fractionation and electrofocusing of isoperoxidases in maize leaves 371

O. MACARIE, The activity of some serum enzymes in male rats with renal lithiasis syndrome induced by ethylene glycol 377

Z. MARCU, I. BRAD, T. PÎRVU, Comparative study of peroxidase isoenzymes in seeds of *Aegilops* and *Triticum* genera 383

C. MEDEŞAN, N. MOLDOVEANU, TR. RĂDULESCU, Lactic acid and lactate dehydrogenase activity in muscle following perfusion with solutions supplied with K^+, Ca^{2+}, and Mg^{2+} ions 391

EUG. PĂUNESCU, A progressive programme for quality control in clinical chemistry laboratories 399

H. POPESCU, C. OPFERMANN, V. POP, Variations of the chemical composition of the essential oil from the fruit of *Amorpha fruticosa* L. 407

L. SCOLNIC, The effect of cesium ions upon lactic acid and total water content as well as upon lactic acid exosmosis in frog gastrocnemius muscle 411

M. ŞERBAN, M. ŞERBAN, Relationships between different carbohydrate metabolic pathways during malonate inhibition 419

M. ŞERBAN, D. COTARIU, G. DĂNICEL, C. IORDACHE, N. MOLDOVEANU, C. MEDEŞAN, T. BENŢIA, Contributions to the biochemical characterization of pig muscles with exudative myopathia 429

REVIEW

C. MOTAŞ, Intracellular relationship between microeterogenity of certain enzymes and proteolytic systems 437

BOOK REVIEW 445

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 4, 349–356, (1973)

BAZELE FILOZOFICE ALE CONCEPȚIEI BIOSTRUCTURALE

E. MACOVSCHI

Rezumat. — În această lucrare, prezentată în ziua de 5 mai 1973 la Sesiunea de comunicări organizată de Comitetul român de istoria și filozofia științei, sînt expuse sumar: esența concepției moleculare despre natura materiei vii, nepotrivirile dintre această concepție și unele fapte experimentale, divergențele dintre unele idei izvorîte din concepția moleculară și preceptele materialismului dialectic, calitatea, particularitatea și esența dialectică a materiei vii, bazele concepției biostructurale, confirmarea concepției biostructurale prin cercetări experimentale și raporturile ei cu concepția moleculară.

Una din concepțiile de bază ale biologiei actuale este concepția moleculară. Conform acestei concepții, materia vie (protoplasma vie) și materia moartă (protoplasma moartă) au aceeași compoziție chimică și structurală. Deosebirea s-ar datora interrelațiilor dintre reacțiile chimice. În materia vie aceste reacții sînt atît de riguros coordonate în timp și spațiu, încît se integrează într-un proces metabolic care asigură autoreproducerea sistemului și manifestarea fenomenelor vieții. În schimb, în materia moartă coordonarea lipsește, așa că reacțiile se produc haotic și duc la distrugerea protoplasmei. Aceste idei, fără să fi fost supuse unei verificări prin cercetări experimentale, se admit ca o axiomă.

Pe baza concepției moleculare și cu sprijinul biochimiei, biologia a înregistrat în ultimele decenii mari progrese. E deajuns să menționăm descoperirile privind rolul acizilor nucleici în ereditate, codul genetic, sinteza genelor, mecanismul biosintezei proteinelor, structura virusurilor și altele. Faptul acesta a întărit și mai mult convingerea în aplicabilitatea generală, în biologie, a concepției moleculare.

Cu toate acestea, analiza obiectivă arată că sub aspect teoretic situația nu este chiar atît de limpede cum pare la prima vedere. Se cunosc fapte care nu se încadrează în concepția moleculară. Se cunosc și aspecte ale acestei concepții care nu sînt confirmate de cercetări experimentale. De exemplu:

— Coloranții pătrunși în celulele vii nu se răspîndesc în masa protoplasmei decît după moartea acesteia. Or, conform teoriei membranei, izvorîtă din concepția moleculară, protoplasma ar fi o simplă soluție apoasă, așa că coloranții ar fi trebuit să difuzeze în protoplasma vie.

— Electrofiziologia modernă, bazîndu-se pe concepția moleculară, pornește de la axiomele teoriei membranei că electroliții celulari,

dizolvaţi integral în apa protoplasmei vii, sînt total disociaţi şi aflaţi în stare de ioni liberi. Or, se ştie demult că această imagine nu corespunde realităţii.

— Repartiţia asimetrică a electroliţilor între celulele vii şi lichidul interstiţial joacă un rol covîrşitor în fenomenele bioelectrice, transmisia sinaptică, secreţia glandulară, absorbţia intestinală, funcţia renală, activitatea celulelor nervoase şi musculare etc. Pentru explicarea acestei repartiţii asimetrice cu ajutorul teoriei membranei se admite existenţa în membranele celulare a unui mecanism special, numit „pompa de sodiu". Or, numeroase cercetări experimentale moderne demonstrează inexistenţa acestei „pompe".

Tot aşa stăm şi cu baza filozofică a concepţiei moleculare despre materia vie. Există neconcordanţă între ideile bazate pe concepţia moleculară şi preceptele materialismului dialectic. De exemplu :

— Concepţia moleculară duce la afirmaţia că viaţa ar fi rezultatul mişcării chimice a materiei. Concepţia materialist-dialectică arată însă că viaţa este rezultatul formei biologice de mişcare a materiei, superioară formelor de mişcare chimică, fizică şi mecanică.

— Teoriile despre originea vieţii bazate pe concepţia moleculară consideră că apariţia vieţii pe pămînt, adică transformarea materiei nevii în materie vie, s-ar fi realizat în clipa cînd un anumit chimism s-a coordonat în primul proces metabolic. De aici urmează însă că această trecere a materiei nevii în materie vie nu a implicat o modificare calitativă, esenţială a ei. În adevăr simpla coordonare a reacţiilor chimice nu schimbă calitatea materiei în care se produc aceste reacţii : organizarea internă, esenţa materiei rămîne aceeaşi atît înainte, cît şi după coordonare. În schimb, dialectica procesului evolutiv arată că, odată cu saltul de la nevie la vie, materia a trebuit să primească o nouă formă de existenţă, o nouă organizare internă, o nouă esenţă, deosebită calitativ de cea veche, caracteristică materiei nevii.

Nepotrivirile de felul celor arătate, de obicei trecute sub tăcere, duc totuşi la două concluzii interesante, şi anume :

— cu toate calităţile ei, concepţia moleculară nu este chiar atît de general valabilă în biologie cum s-a crezut şi cum se mai crede încă ;

— aplicarea concepţiei moleculare în biologie întîmpină dificultăţi în problemele privitoare la natura materiei vii. De aici necesitatea elaborării unei noi concepţii referitoare la această materie.

Ţinînd seamă de aceste concluzii, încă din 1958 am iniţiat cercetări teoretice şi apoi experimentale în vederea elaborării unei concepţii adecvate, concordante cu principiile fundamentale ale materialismului dialectic, recurgînd la „procedeul paralelismelor". El se bazează pe faptul că problemele ştiinţifice şi filozofice privind materia nevie prezintă contingenţe şi analogii cu problemele care privesc materia vie. Prin urmare, cercetînd dialectica materiei nevii şi studiind modul de aplicare a principiilor materialismului dialectic în chimie la materia nevie, s-ar putea trece la extinderea acestor principii la problema naturii materiei vii în biologie, ţinînd, evident, seamă de specificul acesteia. Speram că procedînd în felul acesta, adică urmînd un drum încă necunoscut, dar paralel cu cel pe care-l cunoaştem, am putea ajunge la unele concluzii noi privind viul.

Ansamblul acestor concluzii ar putea oferi baza pentru conturarea concepției pe care doream s-o elaborăm.

★

Dialectica ne învață că un obiect poate fi considerat ca bine cunoscut dacă i se cunosc :

— *calitatea dialectică*, care condiționează, determină însușirile obiectului,

— *particularitatea dialectică*, prin care calitatea obiectului se deosebește de calitatea altor obiecte,

— *esența dialectică*, care constituie specificul, natura obiectului însăși.

Prin urmare, pentru cunoașterea materiei vii trebuie stabilit în ce anume constă calitatea, particularitatea și esența ei.

★

În legătură cu *calitatea dialectică* se știe că fiecare obiect este caracterizat printr-o singură calitate și o mulțime de însușiri determinate de această calitate și că transformarea unui obiect în altul înseamnă trecerea vechii calități în alta nouă, cu care ocazie însușirile vechi se înlocuiesc cu altele noi. Rezultă că dispariția însușirilor vechi, respectiv apariția însușirilor noi, semnalează schimbarea calității obiectului și deci transformarea obiectului vechi în altul nou.

În chimie acest mod de a vedea lucrurile a fost adoptat de mult timp și este unanim acceptat. Se știe doar că însușirile chimice ale substanțelor sînt determinate de structura lor chimică. Înseamnă că structura chimică, purtătoarea însușirilor chimice, reprezintă calitatea dialectică a substanțelor.

În biologie însă, această concepție încă nu a prins rădăcini. Dar, prin analogie cu punctul de vedere adoptat în chimie, putem afirma că, dacă materia vie manifestă însușiri biologice specifice, înseamnă că în ea există o anumită structură biologică specifică, purtătoarea acestor însușiri, așa că tocmai ea, această structură, reprezintă calitatea dialectică a materiei vii. Odată cu moartea, manifestările însușirilor biologice încetează; înseamnă că odată cu moartea această structură biologică specifică viului, numită de noi în 1967 „biostructura", își încetează existența, destrămîndu-se. De aici se desprind următoarele idei :

— Dacă biostructura, respectiv materia biostructurată, reprezintă calitatea dialectică a viului, înseamnă că nu pot fi considerate vii decît sistemele în care există biostructură.

— Structura morfologică a celulelor nu este purtătoarea însușirilor biologice și nu reprezintă biostructura, deoarece continuă să existe și după moartea celulelor, pe cînd biostructura se destramă odată cu moartea și, prin urmare, nu există în materialul biologic mort.

— Investigațiile microscopice și electronomicroscopice nu au pus pînă acum în evidență existența biostructurii, deoarece cercetarea structurilor hiperfine ale protoplasmei s-a făcut întotdeauna pe un material biologic omorît, în care biostructura nu mai există.

— Viaţa a apărut pe planeta noastră începînd din clipa cînd a apărut prima materie biostructurată, oricît de simplă va fi fost ea, căci numai de atunci a devenit posibilă manifestarea însuşirilor specifice viului şi, deci, manifestarea fenomenelor vieţii.

— Dacă avem impresia că un sistem prezintă una sau unele însuşiri ale viului, dar nu le prezintă şi pe celelalte, înseamnă că acele însuşiri nu sînt însuşiri biologice veritabile, ci numai se aseamănă cu ele, iar sistemul respectiv nu conţine biostructură şi, deci, nu este viu. Astfel de sisteme pot servi cel mult ca un fel de modele, mai mult sau mai puţin reuşite, ale viului.

Particularitatea dialectică a unui obiect poate fi dedusă cunoscînd particularitatea dialectică a unui alt obiect, aflat în contradicţie externă cu primul. Dar pentru aceasta este necesar ca cel de-al doilea obiect să formeze cu primul un sistem unitar, în cadrul căruia numai unul dintre cele două componente ar putea exista fără celălalt. În aceste condiţii obiectele sînt în contradicţie externă, ceea ce înseamnă că particularitatea dialectică a unuia este contrară particularităţii dialectice a celuilalt.

Pentru a afla, deci, particularitatea dialectică a viului, caracterizat prin materia lui biostructurată, vom lua în considerare materia nevie, a cărei particularitate dialectică se cunoaşte. Această materie nevie formează împreună cu cea vie un sistem unitar, în care partea nevie poate exista şi fără partea vie, adică fără materia biostructurată, pe cînd viul, şi deci materia lui biostructurată, nu poate exista fără materia nevie, în cadrul căreia viul trăieşte. Prin urmare, între materia nevie şi materia biostructurată sînt relaţii de contradicţie externă, ceea ce înseamnă că particularitatea dialectică a materiei biostructurate este contrară particularităţii dialectice a materiei nevii. Or, materia vie are o altă particularitate dialectică decît materia nevie, deci trebuie să aibă şi o alcătuire diferită de cea moleculară, care o deosebeşte calitativ şi principial de alcătuirea materiei nevii. Deducem de aici că moleculele diferitelor substanţe integrîndu-se în materia biostructurată trec într-o stare specială, caracteristică viului, şi nu se mai comportă ca molecule. Devenind componente ale materiei biostructurate, ele capătă însuşiri noi şi îşi exercită aici anumite funcţii biologice şi cibernetice elementare, pe care nu le pot îndeplini atunci cînd se află în stare de molecule obişnuite. Or, trecerea unei molecule într-o altă stare decît cea normală necesită energie. Prin urmare, formarea şi menţinerea integrităţii materiei biostructurate se asigură printr-un continuu aport de energie provenită din biochimismul celular.

Se ştie că *esenţa dialectică* a unui obiect iese în evidenţă prin contradicţia internă dintre laturile contrare ale obiectului, care nu pot exista în natură separat una de alta şi care se neagă reciproc. Iar negarea reciprocă dialectică este posibilă numai atunci cînd cele două laturi ale obiectului se deosebesc calitativ, reprezintă două etape diferite, dar succesive, ale evoluţiei şi se pot transforma reciproc una în alta.

Deci, dacă viul reprezintă unitatea a două laturi contrare, atunci, pe lîngă materie biostructurată, el trebuie să mai conţină şi o materie de altă categorie, aflată în contradicţie internă cu prima. Dar ce fel de materie este aceasta? Răspunsul nu este greu de dat dacă se ia în considerare faptul că numeroase reacţii biochimice care se produc într-un sistem viu pot fi reproduse aidoma *in vitro*, adică într-o soluţie apoasă aflată în epru-

betă. Înseamnă că și în sistemul viu aceste reacții se produc de asemenea în soluție apoasă, care poate fi numită „soluție intracelulară". Soluțiile au însă alcătuire moleculară. Rezultă de aici că soluția intracelulară are aceeași alcătuire moleculară ca și materia nevie, deși prin compoziția sa cu totul specială ea se deosebește profund de orice materie nevie aflată în afara protoplasmei vii. Prin urmare se poate afirma că soluția intracelulară reprezintă „partea nevie a viului".

Este de remarcat că interrelațiile dintre materia biostructurată și materia care alcătuiește soluția intracelulară corespund întru totul condițiilor negării dialectice reciproce, pe care le-am menționat. În adevăr, materia biostructurată și materia moleculară a soluției intracelulare se deosebesc calitativ, avînd particularități dialectice cu totul diferite; materia biostructurată reprezintă o etapă superioară și imediat următoare de evoluție a materiei în raport cu materia moleculară a soluției intracelulare; materia biostructurată și materia moleculară a soluției intracelulare se transformă reciproc una în alta, adică se neagă reciproc, și tocmai de aceea nu pot exista în natură separat una de alta.

Din prezentarea sumară de mai sus rezultă că am ajuns la cunoașterea dialectică a materiei vii stabilind că:

— biostructura reprezintă *calitatea dialectică* a viului, deoarece ea determină însușirile lui biologice,

— natura nemoleculară a materiei biostructurate reprezintă *particularitatea dialectică* a viului, deoarece prin ea viul se deosebește de neviu,

— unitatea pe care materia biostructurată, nemoleculară, o alcătuiește împreună cu materia moleculară din care este formată soluția intracelulară reprezintă *esența dialectică* a viului, deoarece aceste două categorii de materie constituie cele două laturi contrare ale acestuia.

Astfel s-a conturat baza filozofică pentru elaborarea concepției biostructurale despre natura materiei vii, concepție dezvoltată în ultimii 15 ani și expusă pe larg în cărțile intitulate: *Biostructura*, apărută în 1969, și *Natura și structura materiei vii*, apărută în 1972.

Conform acestei concepții, care în cele ce urmează nu va putea fi schițată decît foarte succint, materia protoplasmei vii se prezintă sub două forme, două aspecte cu totul distincte. O parte se află într-o stare calitativ deosebită de aceea a materiei nevii, fiind integrată într-o structură biologică cu totul specială, pe care am numit-o „biostructură", specifică fiecărui organ și chiar țesut. Această structură evoluează în tot timpul vieții organismului și se modifică sub acțiunea factorilor externi și interni. Nebănuită și necunoscută în trecut, ea este purtătoarea însușirilor viului, există numai în ceea ce este viu, destrămîndu-se odată cu moartea protoplasmei și punînd în libertate componentele integrate în ea. Anumite substanțe pot deveni componente ale materiei biostructurate dacă moleculele lor, acumulînd energie, trec într-o stare specifică, deosebită de aceea în care se găsesc atunci cînd fac parte din materia nevie. În materia biostructurată componentele se leagă între ele prin forțe corelative și formează o structură continuă cu caracter nemolecular și cu comportări cooperative. Astfel, orice modificare a stării unei componente se poate repercuta asupra tuturor celorlalte componente ale materiei biostructurate, modificînd starea și comportarea biostructurii întregi, și prin aceasta starea și comportarea organismului respectiv. Cealaltă parte a materiei protoplas-

mei vii, neintegrată în biostructură, formează aşa-numita soluţie intracelulară, alcătuită din apă liberă şi numeroase substanţe organice şi anorganice dizolvate în ea. Reacţiile biochimice care se produc în soluţia intracelulară furnizează energia necesară atît integrării în biostructură a diferitelor substanţe, cît şi menţinerii integrităţii acestei structuri. La rîndul ei, materia biostructurată reprezintă factorul principal care contribuie la coordonarea biochimismului şi integrarea lui în procesul metabolic caracteristic vieţii. Astfel, prin biostructură şi prin interacţiunea dintre materia biostructurată şi materia soluţiei intracelulare, se realizează forma biologică de mişcare a materiei, superioară formelor de mişcare mecanică, fizică şi chimică.

Important este faptul că cercetările experimentale efectuate între timp pe ţesuturi vii vegetale şi animale cu ajutorul inhibitorilor metabolici, al presiunilor hidrostatice şi al rezonanţei magnetice nucleare de înaltă rezoluţie şi ecou de spin au dovedit existenţa materiei biostructurate în materialul biologic viu şi destrămarea acestei materii odată cu moartea. Tot pe aceste căi s-au obţinut primele informaţii privind atît compoziţia şi însuşirile materiei biostructurate, cît şi comportarea ei în diferite condiţii fiziologice şi experimentale. Astfel a fost confirmată experimental valabilitatea unei concepţii ştiinţifice noi, elaborată pe baza principiilor materialismului dialectic.

Dar lucrurile nu s-au oprit aici. Concepţia biostructurală nu a rămas sterilă. Ea a deschis poarta spre noi cercetări teoretice şi experimentale, fundamentale şi aplicative în diferite domenii ale biologiei, agronomiei şi medicinii. Ca dovadă pot servi rezultatele obţinute în intervalul de timp relativ scurt ce s-a scurs de la elaborarea primelor noţiuni privind biostructura (1958) şi, mai ales, de la găsirea primelor mijloace şi metode de investigare experimentală a materiei biostructurate (1967).

Spre exemplificare se pot menţiona, în primul rînd, unele teorii şi ipoteze izvorîte din concepţia biostructurală, ca :

— teoria biostructurală a permeabilităţii celulare (1965);

— premisele unei teorii biostructurale a memoriei (1966);

— ipoteza biostructurală a originii undelor electroencefalografice (1970);

— ipoteza biostructurală a originii vieţii pe pămînt (1971);

— ipoteza privind rolul materiei biostructurate în alergii (1972), şi altele. Fiecare din ele poate servi ca punct de plecare pentru noi cercetări experimentale corespunzătoare.

În al doilea rînd, interesează constatarea că rezultatele concrete ale unor investigaţii experimentale efectuate de diferiţi cercetători pe baza concepţiei moleculare pot fi şi trebuie revizuite de pe poziţiile concepţiei biostructurale. Astfel apar posibilităţi noi de cercetare chiar şi acolo unde în aparenţă investigaţiile s-au încheiat. Vestita lucrare despre schimburile ionice dintre axonii giganţi de *Sepia* şi mediul extern, publicată de A.L. Hodgkin şi R. D. Keynes în 1955, în care, cercetînd efluxul sodiului radioactiv din axoni, autorii au căutat să fundamenteze ipoteza „pompei de sodiu" şi au încercat să influenţeze activitatea acestei „pompe" cu inhibi-

tori metabolici, a fost reexaminată prin prisma concepției biostructurale, dovedindu-se că efluxul ionilor de sodiu din axoni se face conform legii difuziei a lui Fick și nu împotriva gradientului de concentrație, cum au crezut cei doi autori englezi. S-a mai dovedit că inhibitorii metabolici, ca 2,4-dinitrofenolul, influențează fluxul de ioni nu prin intermediul unei „pompe", ci prin eliberarea de apă și ioni din materia biostructurată a axonilor.

În al treilea rînd vin cercetările experimentale efectuate direct în domeniul biostructurii. Printre ele pot fi menționate :

— comportarea materiei biostructurate a țesuturilor vii sub acțiunea temperaturilor ridicate, razelor ultraviolete și curentului electric ;

— eliberarea apei, ionilor și diferitelor substanțe organice, mai ales a enzimelor, din biostructura frunzelor unor plante agricole ;

— destrămarea parțială a materiei biostructurate sub influența inhibitorilor metabolici ;

— evoluția biostructurii fructelor în cursul păstrării, și altele.

Menționăm că aceste teorii, ipoteze și cercetări experimentale noi au adus anumite precizări privind distribuția asimetrică a electroliților între celulele vii și lichidul interstițial.Aceste precizări implică revizuirea de pe pozițiile concepției biostructurale a multor lucrări publicate în probleme de fiziologie și medicină, lucrări care apar acum într-o lumină nouă. S-au adus precizări cu privire la raporturile dintre allopatie și homeopatie, indicîndu-se rolul important ce revine materiei biostructurate în problemele de terapeutică, etc.

Și mai este ceva. Materia biostructurată, prin caracterul ei nemolecular și prin continuitatea alcătuirii sale, poate reprezenta acea matrice care constituie baza materială a proceselor energetice din organismul viu și poate constitui acel suport material în cadrul căruia se manifestă așazisul cîmp biologic al întregului organism. Astfel, concepția biostructurală oferă biofizicii, în special bioenergeticii, interesante posibilități de investigație, care sînt imposibil de conceput în cadrul structurilor moleculare discrete.

Cum rămîne însă cu concepția moleculară ? De regulă o concepție nouă o înlocuiește pe cea veche. Astfel, în astronomie concepția heliocentrică a înlocuit-o pe cea geocentrică ; în chimie concepția atomo-moleculară a înlocuit-o pe aceea a radicalilor ; în biologie concepția evoluționistă a înlocuit-o pe cea fixistă etc. Dar în cazul concepției biostructurale situația se prezintă altfel. Cele două concepții, moleculară și biostructurală, se referă fiecare la cîte una din cele două laturi dialectic contrare ale materiei vii : materia moleculară și materia biostructurată. De aceea este de prevăzut că în viitor ambele concepții vor coexista, completîndu-se reciproc, pînă se vor contopi într-o singură viziune unitară, care ne va apropia de cunoașterea mai bună decît acum a fenomenului numit „viață".

Concluzie. Concepția biostructurală, bazată pe principiile fundamentale ale materialismului dialectic,

— leagă relațiile biologice de gîndirea filozofică marxistă,

— dă o nouă interpretare naturii materiei vii, fundamental deosebită de interpretarea mecanicistă, bazată pe concepția moleculară,

— deschide noi perspective atît pentru înţelegerea fenomenelor care se produc în organismele vii, cît şi pentru cercetarea experimentală a acestor fenomene.

Prezentat la redacţie
la 7 iunie 1973

Catedra de biochimie,
Universitatea Bucureşti şi
Centrul de biostructură
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, *Biostructura*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1969.
2. E. Macovschi, *Natura şi structura materiei vii*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1972.

PHILOSOPHICAL BASES OF THE BIOSTRUCTURAL CONCEPTION

SUMMARY

In the present work, reported the 5th May 1973 at the communication session sponsored by the Romanian Committee for History and Philosophy of Science are reviewed : the essence of the molecular conception upon living matter nature, the discrepancies between the latter and some experimental findings, the disagreement between some ideas stemming from the molecular conception and the precepts of the dialectical materialism, the quality, the peculiarities and the dialectical essence of living matter, the bases of the biostructural conception, its confirmation by experimental investigations and its relationship with the molecular conception.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 4, 357–361 (1973)

ACTIVITATEA FOSFATAZELOR ACIDE ŞI ALCALINE LA STAFILOCOCII SENSIBILI ŞI LA CEI REZISTENŢI LA UNELE ANTIBIOTICE

ANCA CIOLAC-RUSSU

Rezumat. — Se prezintă rezultatele unui studiu comparativ asupra activităţii fosfatazelor acide şi alcaline pe un număr de 3 tulpini şi 10 mutanţi selecţionaţi *in vitro* de *Staphylococcus aureus*. Determinări le enzimatice au fost realizate prin testul cu *p*-nitrofenil-fosfat. Mutanţii, purtători de determinanţi ai rezistenţei la penicilină, streptomicină, rifampicină şi kanamicină, au demonstrat un potenţial enzimatic schimbat faţă de tulpinile de origine.

Studiul modificărilor enzimatice care însoţesc deseori chimiorezistenţa stafilococilor patogeni, pe lîngă importanţa sa teoretică evidentă, are ca scop practic precizarea mijloacelor de creştere a eficacităţii antibioterapiei antistafilococice, deoarece atît mecanismele de acţiune ale antibioticelor, cît şi apariţia rezistenţei sînt fenomene care interesează metabolismul celulei şi sistemele sale enzimatice.

În cadrul unui studiu mai amplu asupra caracterelor enzimatice ale stafilococilor, am cercetat şi activitatea fosfomonoesterazelor de suprafaţă [1].

La genul *Staphylococcus*, Mesrobeanu şi colab. [2] au semnalat fosfomonoesterazele de tip III şi IV. Studii cantitative asupra activităţii acestor enzime au fost făcute de Barnes şi colab. [3]. Faber şi colab. [4] şi Pay [5] au cercetat corelaţia dintre activitatea acestor enzime şi producerea de hialuronidază şi, respectiv, coagulază.

Mesrobeanu şi colab. [6] au studiat fosfatazele stafilococilor rezistenţi la penicilină, selecţionaţi *in vitro*, fără să găsească o scădere a activităţii enzimatice la mutanţii penicilinorezistenţi; în schimb, tulpinile rezistente la penicilină prezentau un maxim de activitate între pH 6 şi 9, în timp ce tulpina sensibilă parentală demonstra activitatea cea mai intensă la pH 5 — 7.

La tulpinile penicilinorezistente de tip „sălbatic", izolate din clinică, Cannon şi colab. [7] nu au putut evidenţia o corelaţie constantă între activitatea acestor enzime şi chimiorezistenţa tulpinilor.

În nota de faţă prezentăm rezultatele privind activitatea comparativă a fosfatazelor acide şi alcaline la unele tulpini de stafilococ şi la mutanţii lor rezistenţi la antibiotice, selecţionaţi în laborator. Scopul cercetării

a fost de a urmări dacă schimbările genomice survenite prin mutaţia genică cromozomială de rezistenţă determină modificări ale nivelului activităţii fosfatazelor acide şi alcaline.

MATERIAL ŞI METODĂ

Tulpini. Studiul activităţii fosfatazelor acide şi alcaline s-a desfăşurat pe un număr de 13 tulpini (3 tulpini de origine şi 10 mutanţi) al căror mod de selecţionare şi nivel al rezistenţei sînt prezentate în tabela 1.

Selecţionarea mutanţilor rezistenţi la antibiotice s-a realizat prin cultivarea unui inocul bogat al tulpinii sensibile de origine, în prezenţa antibioticului (tabela 1).

Este de semnalat că, în cursul trecerilor tulpinii A pe mediu cu kanamicină, s-au selecţionat doi mutanţi pigmentaţi diferit (în auriu şi alb), cu caractere morfologice şi de creştere diferite (A kan. auriu şi A kan. alb).

Medii. S-au utilizat geloză 2% pH 7,4 şi bulion peptonat pH 7,4.

Testarea nivelului rezistenţei s-a făcut prin metoda dozării în mediu lichid, utilizînd diluţii de la 0,001 UI/ml (μg/ml) pînă la 1000 UI/ml (μg/ml).

Activitatea fosfatazică (acidă şi alcalină) a fost determinată după testul cu *p*-nitrofenil-fosfat [8], adaptat de noi pentru studiul fosfatazelor stafilococilor.

În vederea testării *activităţii fosfatazei acide*, s-a pus în contact 0,5 ml substrat (obţinut din amestecul în părţi egale de tampon citrat de sodiu 0,09 M, pH 4,9, şi de *p*-nitrofenil-fosfat disodic 7,6 mM) cu 0,4 m suspensie bacteriană cu concentraţie de 7—10 mg microb uscat/ml. În paralel s-au preparat martorii: un martor care conţinea 0,5 ml tampon citrat de sodiu diluat ½ şi 0,4 ml suspensie, şi un al doilea martor realizat din 0,5 ml substrat şi 0,4 ml apă distilată. De asemenea, sistemul de reacţie conţinea şi un etalon format din 1,8 ml soluţie 2 μM de *p*-nitrofenol în apă distilată. După o incubare de o oră la 37°C, reacţia a fost oprită prin adăugare de 2 ml NaOH 0,1 M şi, după centrifugare, cantitatea de *p*-nitrofenol eliberată enzimatic a fost determinată spectrocolorimetric, la 405 nm (Spekol, C. Zeiss, Jena).

Activitatea fosfatazei alcaline a fost testată în aceleaşi condiţii, înlocuind însă tamponul citrat cu tampon veronal de sodiu 0,1 M, pH 10, care conţinea şi 0,05 M $MgSO_4$. S-a folosit o cantitate de suspensie bacteriană de 0,2 ml şi sistemele au fost incubate 30 min la 37°C.

Pentru fiecare testare s-au realizat probe triple.

Activitatea fosfatazică s-a exprimat în unităţi internaţionale [8], iar valoarea obţinută s-a raportat în final la concentraţia de microb uscat prezent în suspensie.

Valorile obţinute din media a 5 determinări, realizate în paralel la tulpinile de origine şi mutanţi, separat pentru fosfatază acidă şi fosfatază alcalină, s-au comparat între ele, aplicîndu-se testul *t* (Student) pentru aprecierea statistică a semnificaţiei diferenţelor.

Tabela 1

Tulpinile de stafilococ cercetate

Tulpini de origine	Mutanţi	Modul de obţinere	Nivelul rezistenţei la antibiotice
A	—	Tulp. de referinţă internaţională, *Staphylococcus aureus* Oxford (de colecţie)	sensibilă
	A RMP * I	Selecţionat prin trecerea pe mediu cu rifampicină a tulp. A (mutaţie tip ,,one step'')	1000 µg/ml rifampicină
	A RMP II	idem	idem
	A pen.**	Selecţionat prin treceri pe mediu cu penicilina G ale tulp. A (mutaţie tip ,,multisteps'')	1000 UI/ml penicilină G
	A str.***	Selecţionat prin trecerea pe mediu cu streptomicină a tulp A (mutaţie tip ,,one step'')	1000 µg/ml streptomicină
	A kan. **** (alb)	Selecţionat prin treceri pe mediu cu kanamicină ale tulp A (mutaţie tip ,,multisteps'')	1000 µg/ml kanamicină
G	A kan. (auriu)	idem	idem
	—	Selecţionat prin treceri pe mediu cu penicilină G ale tulp. A (mutaţie tip ,,multisteps'')	50 UI/ml penicilină G
	G RMP I (mutant dublu)	Selecţionat prin trecerea pe mediu cu rifampicină a tulp G (mutaţie tip ,,one step'')	50 UI penicilină + 1000 µg/ml rifampicină
I	G RMP II (mutant dublu)	idem	idem
	—	Tulpină izolată din clinică (tip ,,sălbatic'')	50 µg/ml streptomicină
	I RMP I (mutant dublu)	Selecţionat prin trecerea pe mediu cu rifampicină a tulp. I (mutaţie tip ,,one step'')	50 µg/ml streptomicină + 1000 µg/ml rifampicină
	I RMP II (mutant dublu)	idem	idem

RMP*, pen.**, str.*** şi kan.**** = determinanţi ai rezistenţei la rifampicină, penicilina G, streptomicină şi kanamicină.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din studiul rezultatelor obţinute (sintetizate în tabela 2) se observă următoarele :

1. Rezistenţa la concentraţii mai mari de rifampicină, penicilină G, streptomicină şi kanamicină a mutanţilor genici cromozomiali studiaţi este însoţită de o scădere importantă a *activităţii fosfatazei acide*, semnificativă statistic faţă de tulpinile de origine ($p < 0{,}01$).

Tabela 2

Activitatea fosfatazelor acide şi alcaline la stafilococii de origine şi la mutanţii lor chimiorezistenţi

Tulpina	Fosfataza acidă media determin.	Fosfataza alcalină media determin.
A	438	35,9
A RMP I	293**	23,6**
A RMP II	206,4**	22**
A str.	153**	23,8**
A pen.	182**	131,2**
A kan. (alb)	171**	10,2**
A kan. (auriu)	100**	1,8**
G	327,5	35,6
G RMP I	266,2**	34
G RMP II	250,1**	33,5
I	378	38,6
I RMP I	204**	17**
I RMP II	200**	20**

** Diferenţă distinct semnificativă, $p \leq 0{,}01$.

2. Comparînd valorile înregistrate pentru activitatea fosfatazei acide a celor trei tulpini de origine, se constată că la tulpinile G şi I această activitate este mai scăzută decît la tulpina sensibilă A ; această observaţie trebuie corelată cu rezistenţa tulpinilor G şi I la penicilină G (50 UI/ml) şi, respectiv, la streptomicină (50 μg/ml).

3. În ceea ce priveşte *activitatea fosfatazei alcaline*, rezultatele se disjung în funcţie de chimioterapic ; astfel, în timp ce tulpina penicilinorezistentă (A pen.) dovedea o activitate de aproximativ 3—4 ori mai intensă decît a tulpinii de origine (A), mutanţii rifampicino- şi streptomicinorezistenţi aveau un nivel mai scăzut, dar semnificativ statistic (cu excepţia mutanţilor G RMP I şi G RMP II). Mutanţii kanamicinorezis-

tenți au dovedit cea mai joasă activitate fosfatazică alcalină, fiind de aproximativ 3 ori (A kan. alb) și respectiv 18 ori (A kan. auriu) mai scăzută decît cea a tulpinii A de origine.

În concluzie, rezultatele cercetărilor întreprinse au arătat că, la stafilococ, instalarea chimiorezistenței la penicilină, streptomicină, kanamicină și rifampicină este însoțită de modificări ale activității sistemelor enzimatice acide și alcaline, care în aceste condiții pot fi socotite drept o reflectare fenotipică a mutației genice cromozomiale.

Prezentat la redacție
la 2 iulie 1973

Universitatea București
Facultatea de biologie,
Catedra de microbiologie

BIBLIOGRAFIE

1. M. R. Pollock, în Gunsalus I. C., Steiner R. Y., *The Bacteria*, Academic Press, New York, IV, 121, 1962.
2. L. Mesrobeanu, Eug. Păunescu, *Fiziologia bacteriană*, Edit. Academiei, 1960.
3. E. H. Barnes, J. E. Horris, J. Bacteriol., **73**, 100 (1957).
4. V. Faber, K. Rosendal, Acta Pathol. Microbiol. Scand., **48**, 367 (1960).
5. Y. L. Pay, H. J. Blumenthal, J. Bacteriol., **82**, 124 (1961).
6. L. Mesrobeanu, Eug. Păunescu, Analele Româno-Sovietice, Seria Biologie, **XIV** (III), 57 (1960).
7. F. D. Cannon, V. Z. Hawn, J. Bacteriol., **86**, 1052 (1963).
8. R. Richterich, *Clinical Chemistry* (*Theory and Practice*), S. Krager, Basel, New York, 299 (1969).

COMPARATIVE STUDY OF THE ACID AND ALKALINE PHOSPHOMONOESTERASES OF SENSITIVE AND DRUG RESISTANT STAPHYLOCOCCI

SUMMARY

The paper presents the results of a comparative study on the acid and alkaline phosphomonoesterases activity of three parental and ten mutant strains of Staphylococcus aureus determined by the p-nitrophenil-phosphate test. The mutants were selected "in vitro" and were carrying the cromozomial determinants of drug resistance to penicilin, streptomycin, rifampycin and kanamycin. The drug resistant strains showed a modified level of the phosphomonoesterases activity in comparison with the parental sensitive strains.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 4, 363–370 (1973)

MECANISMELE DE REACȚIE ALE PROCESULUI DE COAGULARE A PLASMEI SANGUINE

FLORICA ENACHE și CECIL POPPA

Rezumat. — Coagularea plasmei sanguine este un proces complex, ale cărui mecanisme de reacție au dat naștere la interpretări diferite.
Pe baza unor rezultate reieșite dintr-o serie de lucrări experimentale s-a observat că, în intimitatea lor, etapele mecanismelor de reacție ale coagulării plasmatice se încadrează în anumite legi precise ale chimiei coloidale. Autorii au conturat și clasificat reacțiile ce se petrec, după cum urmează:
— reacții de chemosorbție,
— reacții enzimatice,
— reacții de policondensare.

Hemostaza are rolul de a apăra organismul de orice pierdere de sînge, prin menținerea unui permanent echilibru fluidocoagulant (fig. 1); se împiedică astfel atît hemoragiile, cît și trombozele [1] — [3].

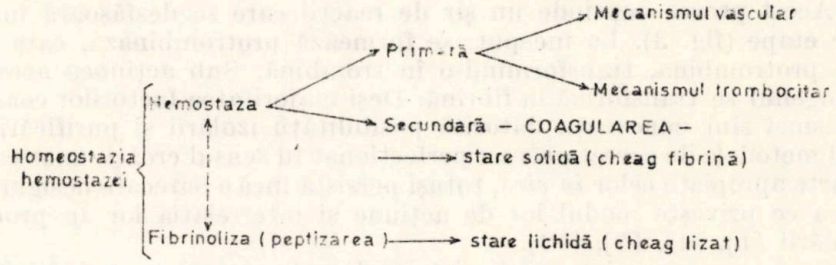


Fig. 1. — Schema echilibrului fluidocoagulant al sîngelui.

Cea mai plastică etapă din acest proces este reprezentată de construcția cheagului de fibrină rezultată din coagularea plasmei [1], [2], [4], [5].

COAGULAREA PLASMEI SANGUINE

Plasma sanguină reprezintă un sistem coloidal, care are ca fază dispersă proteinele și ca mediu de dispersie apa, în care se află dizolvate săruri și diverse substanțe organice [1], [4], [6] — [10].

Capacitatea de gelificare (coagulare) a fibrinogenului, proteină plasmatică, joacă rolul principal în complexul proces al coagulării plasma-

tice; aceasta este rezultanta interreacţiilor unor proteine — substanţe macromoleculare (grupa polielectroliţi amfoteri) — implicate în proces [1], [4], [6], [11]. Ele sînt denumite factori de coagulare (fig. 2), desemnaţi în 1962, la Tokyo, cu cifre romane; astfel li s-au acordat denominative de circulaţie internaţională şi li s-a generalizat semnificaţia [1], [4], [12].

Factorul I = fibrinogenul
Factorul II = protrombina
Factorul III = tromboplastina tisulară
Factorul IV = calciul
Factorul V = proaccelerina
Factorul VI = nu se mai utilizează
Factorul VII = proconvertina
Factorul VIII = factorul antihemofilic A
Factorul IX = factorul antihemofilic B
Factorul X = factorul Stuart-Prower
Factorul XI = factorul Rosenthal
Factorul XII = factorul Hageman
Factorul XIII = factorul stabilizant al fibrinei
Factorul XIV = factorul anti-Willebrand sau factorul plasmatic al adezivităţii placheta *in vivo*.

Fig. 2. — Tabelul factorilor coagulării, cunoscuţi pînă în prezent.

Factorii coagulării intervin într-o serie de fenomene şi reacţii complexe, care duc la denaturarea fibrinogenului solubil, transformîndu-l în fibrină insolubilă.

Acest proces cuprinde un şir de reacţii care se desfăşoară în mai multe etape (fig. 3). La început, se formează protrombinaza, care activează protrombina, transformînd-o în trombină. Sub acţiunea acesteia, fibrinogenul se transformă în fibrină. Deşi majoritatea factorilor coagulării plasmei sînt cunoscuţi, datorită posibilităţii izolării şi purificării lor, şi deşi metodele de cercetare s-au perfecţionat în sensul creării unor condiţii foarte apropiate celor *in vivo*, totuşi persistă încă o oarecare nesiguranţă în ceea ce priveşte modul lor de acţiune şi interrelaţia lor în procesul coagulării [1], [4], [5], [12].

Ceea ce a îngreuiat şi întîrziat înţelegerea exactă a procesului este faptul că rezultatul studiilor efectuate pe sîngele scos din arborele circulator, deci *in vitro*, au fost folosite pentru înţelegerea procesului petrecut *in vivo*.

Investigarea întregului proces pe subiecţi normali şi patologici se face în laboratorul nostru în mod curent. Ea constă în determinarea activităţii nivelului şi a acţiunii fiecărui factor pe trepte de desfăşurare a procesului. Lucrările au pus probleme care ne-au determinat să întreprindem cercetări mai ample care să ţină cont de proprietăţile fizico-chimice ale factorilor reactanţi şi de fenomenele la care se supun în mod obligatoriu. Bazaţi pe toate aceste rezultate, care se află într-o serie de lucrări publicate şi nepublicate încă, încercăm în lucrarea de faţă să dăm o interpretare cît mai corectă fizico-chimică a mecanismelor de reacţie ce se produc în desfăşurarea procesului [1], [3], [4], [7], [11], [13] — [15].

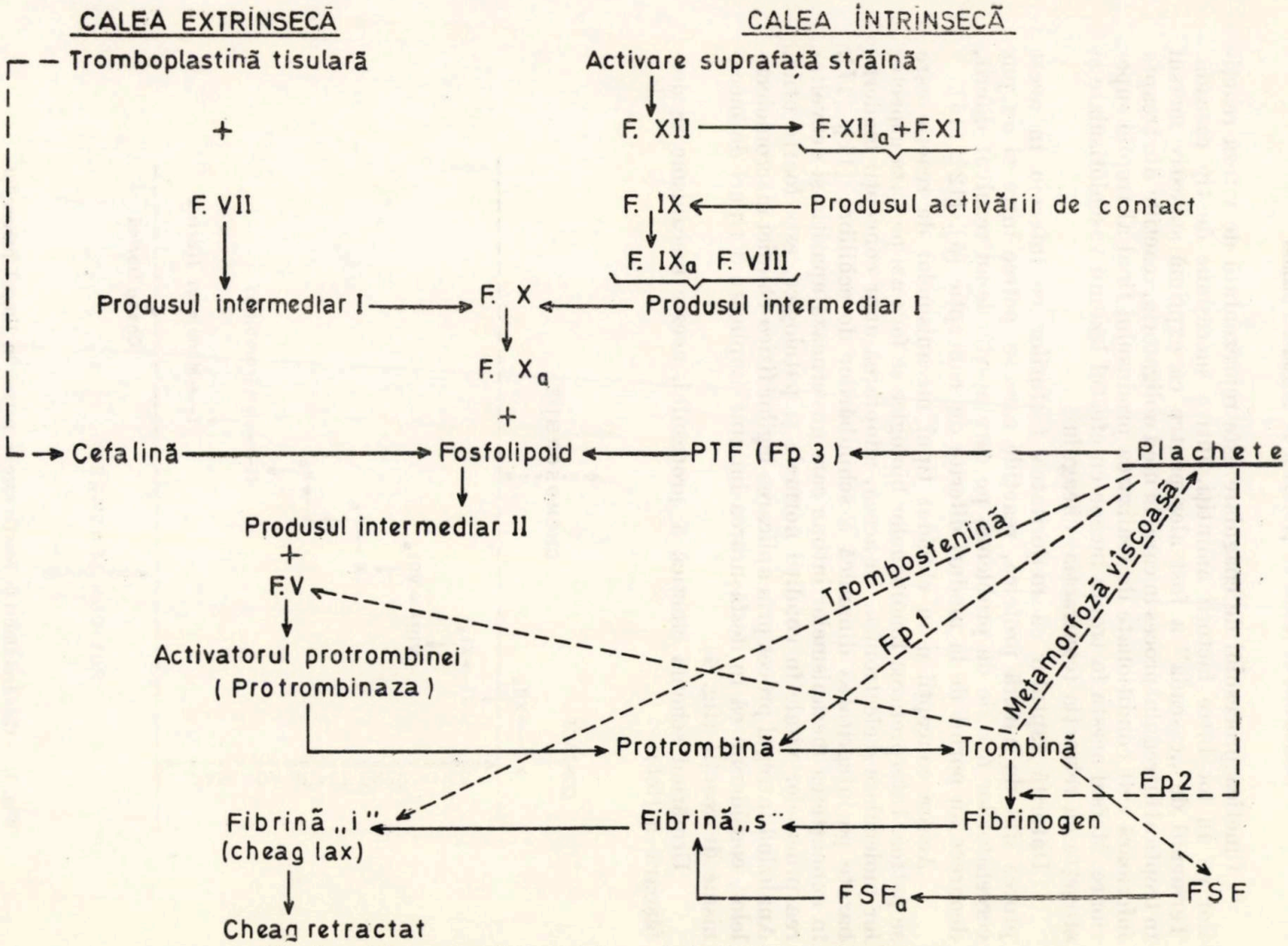


Fig. 3. — Schema coagulării sîngelui, cu cele două căi de desfășurare.

Mecanismele de reacţie ale procesului de coagulare a plasmei

Cinetica procesului de coagulare este reprezentată de viteza reacţiilor ce au loc între factorii amintiţi, într-o succesiune de tip cascadă. Termenul de „cascadă" a fost ales pentru că exprimă sugestiv mersul în trepte al întregului proces în care, în mod obligatoriu, reacţiile din treapta inferioară sînt condiţionate de realizarea produsului final al treptei superioare. Mersul acesta în trepte începe cu efectul leziunii vasculotisulare şi sfîrşeşte cu retracţia (contracţia) cheagului.

Datorită faptului că majoritatea factorilor ce intervin în acest proces sînt de natură proteică, reacţiile care se petrec între ei au pus cercetătorilor o serie de probleme, pe care aceştia le-au rezolvat diferit, deoarece au pornit de la moduri diferite de concepţie [5], [12], [16].

Aceste concepţii n-au elucidat tipul mecanismelor de reacţie care se petrec. Interpretarea fenomenelor biologice se face azi pe baza aspectelor moleculare şi electronice. De aceea, adoptarea unor concepţii moderne bazate pe integritatea dinamică a schimbărilor de echilibru [11], [17], în cunoaşterea mecanismelor intime care guvernează apariţia şi dezvoltarea proceselor vitale în condiţii normale şi patologice, este foarte utilă. Analizînd întregul proces prin aplicarea legilor fizico-chimiei macromoleculelor, considerăm că în desfăşurarea lui sînt implicate 3 tipuri de mecanisme de reacţie (fig. 4).

Urmărind schema cinetică a procesului, aceste mecanisme se desfăşoară astfel :

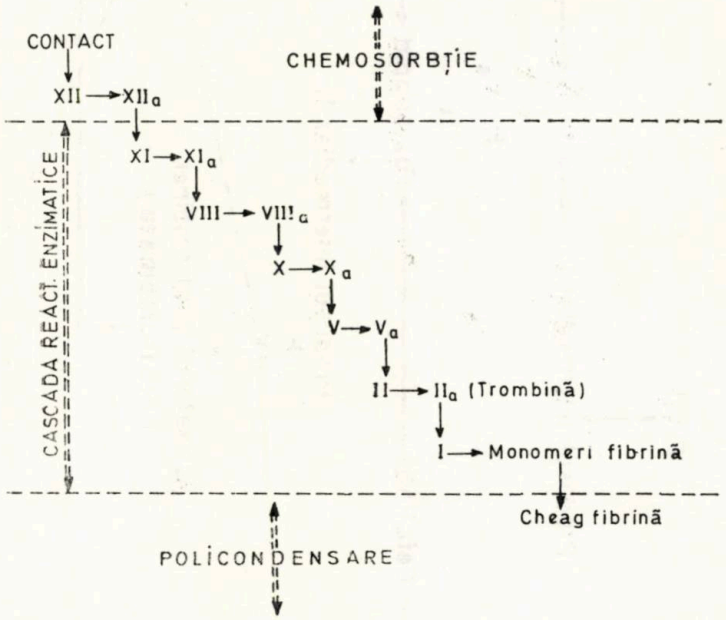


Fig. 4. — Cele trei tipuri de reacţie care se petrec în timpul procesului de coagulare plasmatică.

1) Procesul în cascadă debutează cu o reacție de contact care, prin chemosorbție, activează F XII, primul factor care intră în competiție [7], [15], [18]. Chemosorbția este procesul de formare a unor combinații de suprafață și depinde de felul legăturilor și de natura combinațiilor formate. Faptele se petrec, conform principiului enunțat, astfel: cînd F XII, inactiv din punct de vedere reacțional, ajunge în cîmpul electric al suprafeței adsorbantului (*in vivo*, endoteliul vascular lezat sau, *in vitro*, peretele de sticlă) are loc o deplasare reciprocă a electronilor (polarizare). Se formează o combinație cu structură mixtă (combinație de suprafață), în care electronii nivelurilor respective sînt numai parțial deplasați. Locurile sau punctele active ale suprafeței unde se aplică forțele electrice prin care se formează legăturile electrovalente sînt, de obicei, defectele suprafeței: endoteliul lezat sau rugozitatea peretelui de sticlă. Urmează apoi, a doua fază, desorbția reversibilă, cu separarea produsului final al reacției, în speță F XII, activat. Schematic cele de mai sus se petrec astfel (fig. 5):

— formarea unui complex activat de adsorbție pe suprafața adsorbantului;

— reacția complexului activat de adsorbție cu alte molecule adsorbite;

— formarea unui complex activat de desorbție, din care se separă produșii finali ai reacției.

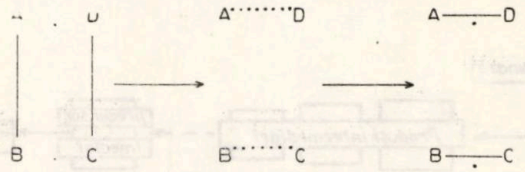


Fig. 5. — Schema etapelor chemosorbției (punctele = centre active de pe suprafața de contact).

2) Activat, F XII acționează asupra următorului factor, XI, ce se află tot în stare inactivă; îl activează și, din acest moment, procesul continuă astfel: factorul inactiv, odată activat, acționează enzimatic asupra următorului, ca asupra unui substrat, luînd naștere un produs care în reacția următoare devine enzimă.

Schematic aceasta se poate exprima în felul următor:

$$S_1 \xrightarrow{E_1} P_1 \qquad P_1 = E_2$$

$$S_2 \xrightarrow{E_2} P_2 \qquad P_2 = E_3 \ldots \text{etc.}$$

$$\ldots\ldots$$

$$S_n \xrightarrow{E_n} P_n$$

Se consideră că E_1 este F XII activat, atunci S_1 = F XI; P_1 = = F XI_a = E_2 și așa mai departe.

După cum se vede, după declanșare procesul constă dintr-o serie de interacțiuni între factorii de coagulare, în care fiecare factor de coagulare este, la rîndul său, substratul acțiunii celui dinainte, și enzima catalitică

a conversiunii următorului. Mecanismul acestor reacţii are la bază teoria electronică, care îl lămureşte cel puţin parţial. În primul rînd se realizează legătura între substrat şi centrul activ al enzimei, iar apoi ruperea hidrolitică a substratului odată cu refacerea enzimei. Deci cel de-al doilea mecanism care se petrece este cel enzimatic [19].

3) Caracterul enzimatic al reacţiilor se păstrează pînă la faza terminală, în care trombina a atacat fibrinogenul (fig. 6). Trombina, factor cu activitate enzimatică puternică, hidrolizează unele legături peptidice din molecula de fibrinogen. Ca efect al acestei acţiuni proteolitice se desprind fibrinopeptide şi rezultă monomeri de fibrină [1], [19].

Din acest moment, reacţiile nu mai sînt enzimatice. Monomerii de fibrină se unesc întîi longitudinal şi apoi transversal, formînd o reţea de fibre încrucişate, cu o structură tridimensională. Macroscopic ea are aspect de gel, care nu este altceva decît cheagul de fibrină. Reacţiile care au dus la construcţia acestuia sînt reacţii de policondensare, caracteristice formării produşilor macromoleculari. Argumentele care vin în sprijinul teoriei sînt fundamentate de caracteristicile reacţiilor de policondensare, spre deosebire de cele de polimerizare. Ele sînt următoarele :

— transformarea fibrinogenului în fibrină este un proces care se întîmplă în mai multe trepte (trei);

— reacţiile acestui proces se petrec în mai multe sensuri (longitudinal şi transversal);

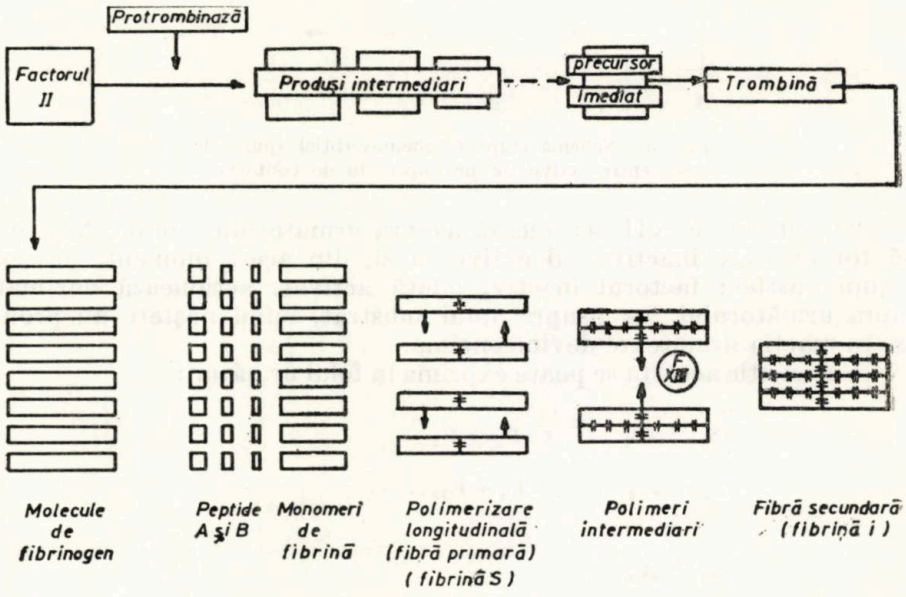


Fig. 6. — Trombino- şi fibrinoformarea (după Raby, 1966).

—procesul duce la formarea mai multor specii de molecule (fibrinopeptide, monomeri de fibrină, hidraţi de carbon, molecule de apă şi molecule de amoniac);

— masa moleculară a produsului format crește treptat, pe măsură ce se petrece reacția [1], [6], [11].

Trebuie amintit că întregul proces de coagulare a plasmei este catalizat de prezența calciului, care se află în stare ionică în plasma sanguină.

Cinetica acestui proces este reprezentată de viteza de desfășurare a reacțiilor, care în practică se măsoară cronometrîndu-se timpul în care plasma a trecut din starea lichidă în starea solidă.

CONCLUZII

Procesul de coagulare a plasmei sanguine este un complex de mecanisme de reacție. Din punct de vedere fizico-chimic ele sînt, conform concepției noastre, următoarele :

1) chemosorbție,
2) reacții enzimatice,
3) reacții de policondensare.

Prezentat la redacție
la 2 iulie 1973

Centrul de hematologie — București, Lab. de hemostază

BIBLIOGRAFIE

1. Florica Enache, *Cinetica transformării fibrinogenului în fibrină*, Teză de doctorat, 1973.
2. C. Raby, *Biologie des hémorragies et des thromboses*, Masson et C-ie Ed., Paris, 1966.
3. C. Poppa, Florica Enache, Documenta Haematologica, *1*, 75 (1967).
4. S. Tilenschi, Florica Enache, Documenta Haematologica *1*, 15 (1972).
5. Mihaela Papilian, *Coagularea sîngelui*, Edit. Academiei, București, 1968.
6. Ch. Tanford, *Physical chemistry of macromolecules*, John Wiley and Sons, Inc., Washington, 1961.
7. S. Tilenschi, *Chimie coloidală*, Edit. tehnică, București, 1964.
8. C. D. Nenițescu, *Chimie generală*, Edit. tehnică, București, 1963.
9. Eugenia Soru, *Biochimie medicală*, Edit. medicală, București, 1963.
10. P. Karlson, *Manual de biochimie*, Edit. medicală, București, 1967.
11. S. Tilenschi, *Chimia macromoleculelor*, Curs Universitate, 1971.
12. Rosemary Biggs, R. G. Macfarlane, *Human blood coagulation and its disorders*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1962.
13. C. Poppa, I. Popa, Florica Enache, Volumul lucrărilor primului simpozion de hematologie, Edit. medicală, București, 1960, p. 143.
14. Florica Enache, C. Poppa, Documenta Haematologica, *1*, 9 (1968).
15. C. Poppa, Florica Enache, Maria Cernat, St. cerc. med. int., **13**, 489 (1972).
16. W. H. Seegers, Clin. Chem., **14**, 97 (1968).
17. S. Petrea, *Termodinamica statistică a macromoleculelor*, Edit. didactică și pedagogică, București, 1968.
18. N. L. Nossel, *The contact phase of blood coagulation*, Blackwell Scientific Publications. Oxford, 1964.
19. S. Capîlna, *Biochimie dinamică*, Edit. medicală, București, 1971.

THE REACTION MECHANISM OF THE PLASMA COAGULATION PROCESS

SUMMARY

The blood plasma clotting is a complex process, whose mechanism of reaction has given rise to various interpretations.

Relaying on experimental results, it has been observed that the steps of the reaction mechanisms of the plasma clotting, (in their strict intimacy) are affiliating with the precise laws of the colloidal chemistry. The authors have outlined and classified these reactions as follows :

— chemisorption reactions,
— enzymatic reactions,
— polycondensation reactions.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 4, 371—375 (1973)

SEPARAREA CROMATOGRAFICĂ ŞI ELECTROFOCALIZAREA IZOPEROXIDAZELOR DIN FRUNZELE DE PORUMB

IOANA HAGIMA

Rezumat. — Peroxidaza din extractul proteic brut din frunzele de porumb s-a fracţionat prin cromatografia pe CM-Sephadex C-50, în trei componenţi. La electroforeză în gel de agar s-a evidenţiat că fiecare din aceşti componenţi cuprinde un număr diferit de forme moleculare cu mobilităţi electroforetice apropiate. Punctele izoelectrice ale acestor forme moleculare ocupă domeniul de pH 4,0—8,0. Nu există paralelism între sarcina electrică globală şi punctul izoelectric la izoenzimele cercetate.

Peroxidaza din plante este o enzimă larg cercetată, confirmîndu-se prin diferite metode eterogenitatea sa moleculară. De cîţiva ani în atenţia noastră se găseşte peroxidaza din cereale, şi în principal aceea din porumb. Am investigat prin metode electroforetice şi imunochimice distribuţia peroxidazei şi evoluţia formelor sale moleculare în diferite formaţiuni ale seminţei negerminate şi germinate, pînă în stadiul de frunze [1] — [3]. Cercetările noastre asupra peroxidazei din frunzele de porumb ne-au arătat că din punct de vedere electroforetic în gel de agar enzima poate fi separată în opt fracţiuni [2]. Din punct de vedere imunochimic fracţiunile evidenţiate se grupează în trei izoenzime : două complet diferite şi a treia parţial asemănătoare cu una din ele.

Pentru caracterizarea în continuare a acestor izoenzime am extins cercetările prin folosirea separării cromatografice pe un cationit slab. Maximele peroxidazice obţinute au fost supuse apoi electroforezei şi focalizării izoelectrice pentru a stabili dacă conţin izoenzime unitare sau în amestec.

Separarea cromatografică pe schimbători de ioni a fost folosită în caracterizarea peroxidazei din diverse surse vegetale [4] — [10]. Peroxidaza din frunzele de porumb nu a fost studiată din acest punct de vedere

MATERIALE ŞI METODE

Materialul vegetal l-au constituit frunze de porumb (*Zea mays*) crescute în condiţii de lumină artificială, recoltate la 10—12 zile de la semănare. Frunzele s-au trecut printr-o moară de laborator, iar extracţia s-a făcut cu o soluţie de NaCl 0,9 %, în raport de 1g material/0,4 ml soluţie timp de o oră. Omogenatul s-a trecut prin tifon, s-a centrifugat 10 min la 4000 g, iar supernatantul s-a dializat peste noapte faţă de apă distilată şi s-a liofilizat. Preparatul liofilizat este denumit în lucrare extract proteic

brut. Atît procedeele de separare cît şi determinările calitative şi cantitative ale activităţii peroxidazei s-au realizat la temperatura camerei.

Cromatografia s-a efectuat pe CM-Sephadex C-50; alegerea acestui schimbător s-a făcut după testarea capacităţii de adsorbţie a cîtorva cationiţi şi anioniţi, printre care: CM- şi DEAE-celuloza, Dowex-50, DEAE-Sephadex A-50, în diferite sisteme tampon. Coloana (23 × 2,2cm) s-a echilibrat în tampon acid acetic-acetat de sodiu 0,005 M, pH 4,4, şi s-au aplicat 6,5 ml extract proteic brut, ce a conţinut 7200 γ-proteină/ml. Eluţia enzimei de pe coloană s-a făcut prin aplicarea tamponului acid acetic-acetat de sodiu, pH 4,4, de molarităţile: 0,1, 0,2, 0,4 şi 0,5 M. S-au colectat 80 de fracţiuni de cîte 5 ml, cu colectorul automat LKB-Uvicord Type 7000, viteza curgerii fiind de 60 ml pe oră.

Determinarea activităţii peroxidazei din eluate s-a făcut colorimetric, după metoda Macnicol [6], folosindu-se, ca donor de hidrogen, guaiacolul. Activitatea peroxidazei s-a exprimat în unităţi enzimatice, deoarece s-a constatat că între absorbţie şi activitatea enzimei este o relaţie liniară pînă la o absorbţie de cel mult 1,0. Citirile s-au efectuat la colorimetrul FEK-56 II, la 400 mμ, faţă de proba-martor (fără apă oxigenată).

Dozarea proteinei s-a făcut prin metoda Lowry, modificată de Miller [11], folosind drept standard albumină serică bovină.

Electroforeza maximelor enzimatice obţinute s-a efectuat în gel de agar, în tampon acid boric-borax, 0,2 M, pH 8,6, pe plăci de sticlă (2,5 × × 7,5 cm), la 200 V, 1,3 mA/cm, timp de 105 min. Pentru evidenţierea activităţii peroxidazei am utilizat benzidină preparată după metoda Bojarkin [12].

Focalizarea izoelectrică s-a realizat pe plăci de sticlă (2,5 × 7,5 cm) în agaroză 1% ce a conţinut amfoliţi 0,5% din domeniul de pH 3—10 (LKB-Produkter AB), după metoda lui Catsimpoolas [13]. Rezervorul anodic a conţinut acid fosforic 5%, iar cel catodic etanolamină 5%. Experienţele s-au efectuat la 140 V, timp de o oră după stabilizarea curentului. Revelarea activităţii enzimatice s-a făcut tot după metoda Bojarkin.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Separarea extractului proteic brut din frunzele de porumb pe CM-Sephadex C-50 a evidenţiat trei maxime peroxidazice, dintre care primul, denumit maximul A, a fost fracţiunea neadsorbită de schimbător. În acest component s-a regăsit aproximativ 10% din activitatea peroxidazei aplicată pe coloană. Maximul enzimatic eluat în tamponul acid acetic-acetat de sodiu, 0,2 M, denumit maximul B, a cuprins aproximativ 52% din activitatea enzimatică totală, iar cel de-al treilea maxim, maximul C, eluat în acelaşi tampon, dar 0,4 M, a conţinut aproximativ 21% din activitatea enzimei aplicată iniţial. Folosirea în continuare a soluţiilor tampon de molarităţi superioare, pînă la 1 M, nu a mai evidenţiat nici un maxim enzimatic. Menţionăm că, dintre cele trei maxime enzimatice depistate, numai primul corespunde maximului proteic (fig. 1).

Electroforeza extractului proteic iniţial a relevat existenţa a 8 forme moleculare ale peroxidazei, fapt arătat şi într-o lucrare anterioară [2].

Comparativ cu migrarea amidonului, 5 dintre aceste fracţiuni sînt electronegative, a 6-a este situată la punctul electric zero, iar benzile 7 şi 8 sînt electropozitive (fig. 2). După electroforeza maximului A neadsorbit, care a traversat primul coloana cu CM-Sephadex C-50, s-au evidenţiat pe enzimo-

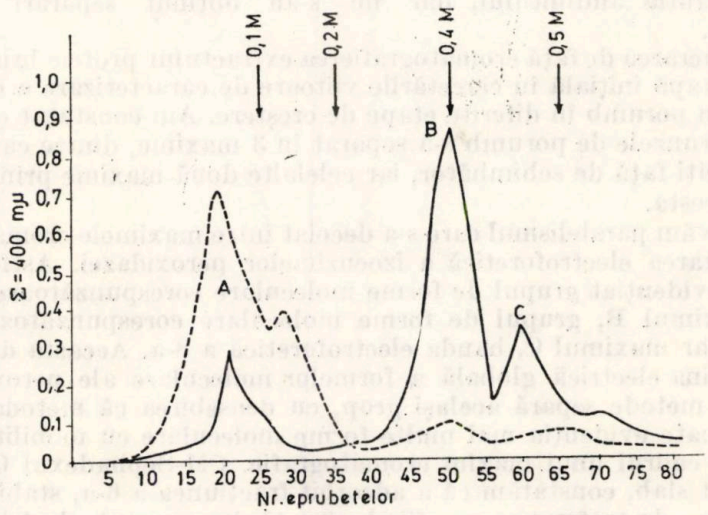


Fig. 1. — Profilul de eluţie al peroxidazei din frunzele de porumb pe CM-Sephadex C-50, în tampon acid acetic-acetat de sodiu, 0,005 M, pH 4,4. Săgeţile indică adăugarea tamponului de diferite concentraţii.

———— peroxidaza
– – – – proteina (0,1/curbă = 1000 γ -prot./ml).

gramă primele 5 benzi electronegative peroxidazice, a căror distribuţie este identică cu a acelora din extractul iniţial. Cel de-al doilea maxim enzimatic, B, s-a separat la electroforeză în gel de agar în două benzi, corespunzătoare fracţiunilor 6 şi 7 din extractul total. Al treilea maxim, C, a conţinut fracţiunea electroforetică a 8-a, corespunzătoare benzii celei mai electropozitive din extractul iniţial.

Focalizarea izoelectrică constituie un important mijloc fizico-chimic de analiză a izoenzimelor [14] — [19] şi s-a demonstrat cu ajutorul ei existenţa unui număr mult mai mare de forme moleculare decît prin alte metode. Am recurs la ea pentru a caracteriza şi după punctele lor izoelectrice formele moleculare ale peroxidazei. Astfel, extractul proteic brut electrofocalizat în agaroză, în domeniul de pH 3—10, a condus la evidenţierea a 8 benzi peroxidazice care, după poziţia lor pe placă, ocupă intervalul de pH 4,0 — 8,0 (fig. 3). După electrofocalizarea maximului A neadsorbit s-au obţinut toate cele 8 benzi cu activitate peroxidazică, observîndu-se doar că a 7-a şi mai puţin benzile 5 şi 6 prezintă o activitate mai diminuată, comparativ cu extractul brut. Maximul enzimatic B s-a separat în 2 benzi cu punctele izoelectrice situate aproximativ la pH 6,0 — 6,2. Aceste 2 benzi se observă numai în cazul unei interacţiuni de scurtă durată între enzimă şi substrate (2—3 min), ele unindu-se într-o singură bandă, cum se remarcă în figura noastră, după o incubare mai prelungită

(5 — 10 min). La focalizarea izoelectrică a maximului C s-a vizualizat o singură bandă situată aproximativ la pH 6,7. În toate cazurile relevarea s-a făcut atît cu benzidină, cît şi cu guaiacol, imaginile obţinute fiind similare. S-au efectuat experienţe de electrofocalizare variind diferiţi parametri, ca, de exemplu : timpul de migrare, tensiunea curentului aplicat şi concentraţia amfolitului, dar nu s-au obţinut separări calitativ superioare.

În lucrarea de faţă cromatografierea extractului proteic brut o considerăm o etapă iniţială în cercetările viitoare de caracterizare a izoperoxidazelor din porumb în diferite etape de creştere. Am constatat că peroxidaza din frunzele de porumb s-a separat în 3 maxime, dintre care primul fără afinităţi faţă de schimbător, iar celelalte două maxime prinse relativ slab de acesta.

Relevăm paralelismul care s-a decelat între maximele cromatografice şi comportarea electroforetică a izoenzimelor peroxidazei. Astfel, maximul A a evidenţiat grupul de forme moleculare corespunzătoare benzilor 1—5, maximul B, grupul de forme moleculare corespunzătoare benzilor 6—7, iar maximul C, banda electroforetică a 8-a. Aceasta denotă că, după sarcina electrică globală a formelor moleculare ale peroxidazelor, cele două metode separă acelaşi grup, cu deosebirea că metoda electroforetică poate evidenţia mai multe forme moleculare cu mobilităţi apropiate, din cadrul unui maxim cromatografic. CM-Sephadexul C-50 fiind un cationit slab, constatăm că a adsorbit fracţiunea a 6-a, stabilită după mobilitatea electroforetică ca fiind situată la punctul electric zero şi fracţiunile 7 şi 8, slab electropozitive.

Analiza prin focalizarea izoelectrică a maximelor cromatografice ne-a condus la constatarea că maximul A, corespunzător enzimei neadsorbite, conţine, este adevărat într-o cantitate mai redusă, şi fracţiunile adsorbite de schimbător. Fracţiunile evidenţiate în maximul B (benzile 5 şi 6), ca şi fracţiunea a 7-a, relevată în maximul C, sînt forme moleculare care au punctele izoelectrice aproximativ la pH 6,0 — 6,2, respectiv 6,7. Corelăm această constatare cu faptul că CM-Sephadexul C-50, cunoscut ca un cationit slab, fixează proteinele slab acide. Constatăm că în urma electrofocalizării se evidenţiază în maximul A şi fracţiunile care se găsesc în maximele B şi C. Această comportare se explică prin aceea că proteinele-enzimă a căror sarcină electrică globală este identică pot avea puncte izoelectrice diferite. Capacitatea de adsorbţie a schimbătorului de ioni nu a fost depăşită de cantitatea proteinei aplicată, căci aceasta s-ar fi observat la electroforeză. Această comportare diferită la electroforeză şi electrofocalizare arată că numărul de 8 benzi evidenţiate în extractul brut prin cele două metode nu presupune vreo corespondenţă între ele ; fiecare metodă se bazează pe alţi parametri de separare.

Electrofocalizarea mai reliefează şi un alt aspect, acela că în frunzele de porumb, în afară de formele moleculare slab acide ale peroxidazei, care pot fi adsorbite de un cationit slab, există şi o formă moleculară cu punctul izoelectric în jur de pH 7,8 — 8,0, care rămîne neadsorbită.

Analiza datelor de mai sus ne determină să apreciem ca pozitivă metoda electrofocalizării în caracterizarea unei protein-enzime, şi să o considerăm, alături de metoda electroforezei, utilă în caracterizarea izoenzimelor.

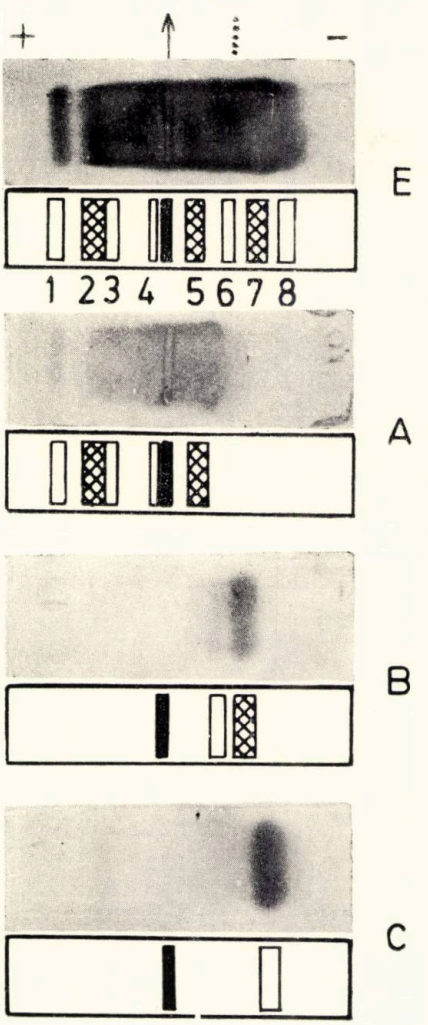


Fig. 2. — Electroforegrama maximelor peroxidazice în agar, în tampon acid boric-borax 0,2 M, pH 8,6, relevată cu benzidină.

→ originea
. . . punctul electric zero.
E — extract inițial
A — maximul A
B — maximul B
C — maximul C

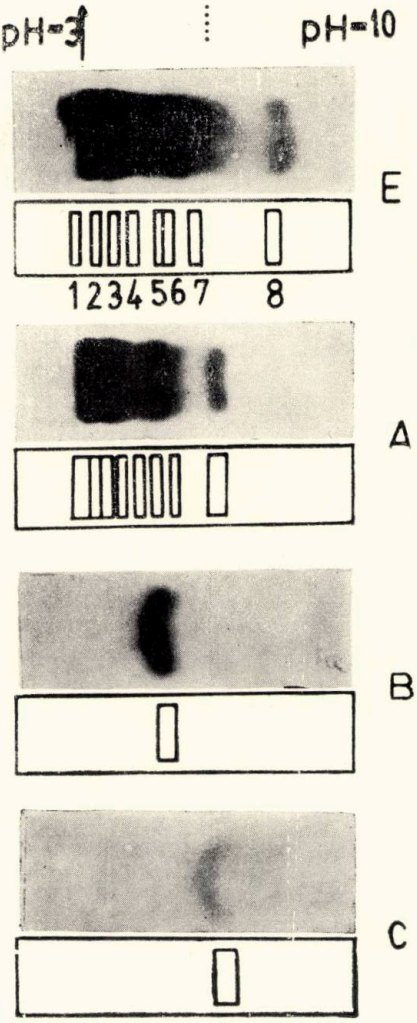


Fig. 3. — Focalizarea izoelectrică în agaroză a maximelor peroxidazice, în gradient de pH 3 — 10, 1 oră, 140 V (notațiile maximelor ca în fig. 2).

CONCLUZII

1. Activitatea peroxidazei din frunzele de porumb s-a separat în trei componenți prin cromatografierea pe CM-Sephadex C-50.

2. Prin estimări cantitative s-a demonstrat că activitatea peroxidazei este inegal distribuită în cele trei maxime enzimatice: A = 10 %, B = 52 %, C = 21 %.

3. La electroforeza în gel de agar s-au evidențiat pentru fiecare maxim cromatografic enzimograme caracteristice.

4. Izoperoxidazele din frunzele de porumb au punctele izoelectrice situate între pH 4,0 și 8,0.

5. Nu există paralelism între sarcina electrică globală și punctul izoelectric la izoenzimele cercetate.

Prezentat la redacție
la 6 iulie 1973

Centrul de biostructură
București

BIBLIOGRAFIE

1. V. Alexandrescu, I. Călin, Rev. roum. Biochim., **6**, 171 (1969).
2. I. Hagima-Călin, St. cerc. biochim., **13**, 47 (1970).
3. V. Alexandrescu, I. Hagima, Rev. roum. Biochim., **10**, 15 (1973).
4. K. Tomyama, M. A. Stahmann, Plant Physiol., **39**, 483 (1964).
5. G. L. Farkaș, M. A. Stahmann, Phytopathol., **56**, 669 (1966).
6. P. K. Macnicol, Arch. Biochem. Biophys., **117**, 347 (1966).
7. L. Sequeira, L. Mineo, Plant Physiol., **41**, 1200 (1966).
8. G. Mazza, C. Charles, M. Bouchet, Biochim. biophys. Acta, **167**, 89 (1968).
9. L. M. Shannon, E. Kay, J. J. Lew, J. biol. Chem., **241**, 2166 (1966).
10. T. Takeo, Y. Kato, Plant. Cell. Physiol., **12**, 217 (1971).
11. G. L. Miller, Analyt. Chem., **31**, 964 (1959).
12. A. N. Bojarkin, Biohimia, **16**, 352 (1951).
13. N. Catsimpoolas, Science Tools, **16**, 1 (1969).
14. H. Delincee, B. Radola, Biochim. biophys. Acta, **200**, 404 (1970).
15. H. Delincee, B. Radola, F. Drawert, Int. J. Rad. Biol., **19**, 93 (1971).
16. H. Delincee, B. Radola, Analyt. Biochem., **48**, 536 (1972).
17. B. Radola, F. Drawert, Brauwissenchaft, **23**, 449 (1970).
18. L. W. Sae, A. M. Kodoum, B. A. Cunningham, Phytochem., **10**, 1 (1971).
19. W. Rücker, B. Radola, Planta, **99**, 192 (1971).

CHROMATOGRAPHYCAL FRACTIONATION AND ELECTROFOCUSING OF ISOPEROXIDASES IN MAIZE LEAVES

SUMMARY

The peroxidase in crude extract of maize leaves was separated in three fractions by chromatography on CM-Sephadex C-50. Each of these fractions revealed by agar gel electrophoresis different numbers of molecular forms of closed electrophoretical mobilities. The isoelectric points of these molecular forms are ranged between pH 4,0 — 8,0. No relationship was found between the overall electrical charge and the isoelectric point of the investigated isoenzymes.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 4, P. 377–381 (1973)

ACTIVITATEA UNOR ENZIME SERICE LA ŞOBOLANII MASCULI CU SINDROM LITIAZIC RENAL INDUS PRIN ETILENGLICOL

O. MACARIE

Rezumat. — În serul provenit de la şobolani masculi trataţi cu etilenglicol asociat sau nu cu substanţe de protecţie a fost determinată activitatea enzimatică a aldolazei, lactat-dehidrogenazei, sorbitol-dehidrogenazei, glutamooxalacetat-transaminazei, glutamopiruvat-transaminazei şi a fosfatazei alcaline. La animalele cu sindrom litiazic, nivelul activităţii glutamopiruvat-transaminazei, lactat-dehidrogenazei şi aldolazei, alături de datele histochimice, indică prezenţa unor leziuni ale hepatocitului aflate într-un stadiu disenergetic incipient. S-a observat un oarecare paralelism între gradul de degradare al etilenglicolului, între gradul de inhibare a acestei degradări de către substanţele protectoare (citrat şi etanol) şi nivelul activităţii enzimatice.

În cadrul unui studiu în care ne-am preocupat de modificările biochimice care apar în organism în prezenţa litiazei renale provocate, am expus într-un articol anterior [1] rezultatele obţinute prin electrotoreza în gel de poliacrilamidă a proteinelor serice provenite de la şobolanii fratați cu etilenglicol asociat sau nu cu substanţe de protecţie. În continuarea cercetării noastre, în lucrarea de faţă am urmărit, în serul provenit de la şobolanii trataţi eu etilenglicol, activitatea următoarelor enzime: fructozo-1,6-difosfat-aldolaza (ALD), fosfataza alcalină (FAL), lactat-dehidrogenaza (LDH), sorbitol-dehidrogenaza (SDH), glutamooxalacetat-transaminaza (GOT) şi glutamopiruvat-transaminaza (GPT).

MATERIAL ŞI METODĂ

Modul de inducere a litiazei renale şi de tratare a loturilor de animale este cel descris într-o comunicare anterioară [1]. Sîngele a fost prelevat din aorta abdominală.

La determinarea activităţii enzimatice serice au fost aplicate următoarele tehnici:

Spectrocolorimetrice după:

— metoda Bruns-Bergmeyer [2 a] pentru ALD;
— metoda Bodansky [3] pentru FAL;

Spectrofotometrice în UV după:

— metoda Bergmeyer, Bernt şi Hess [2 b] pentru LDH;
— metoda Gerlach [2 c] pentru SDH;
— metoda Bergmeyer şi Bernt [2 d] pentru GOT şi
— metoda Wroblewski şi La Due [4] pentru GPT.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele determinărilor activităţii enzimatice sînt prezentate, cu abaterea medie pătratică (deviaţia standard), în figurile 1 şi 2.

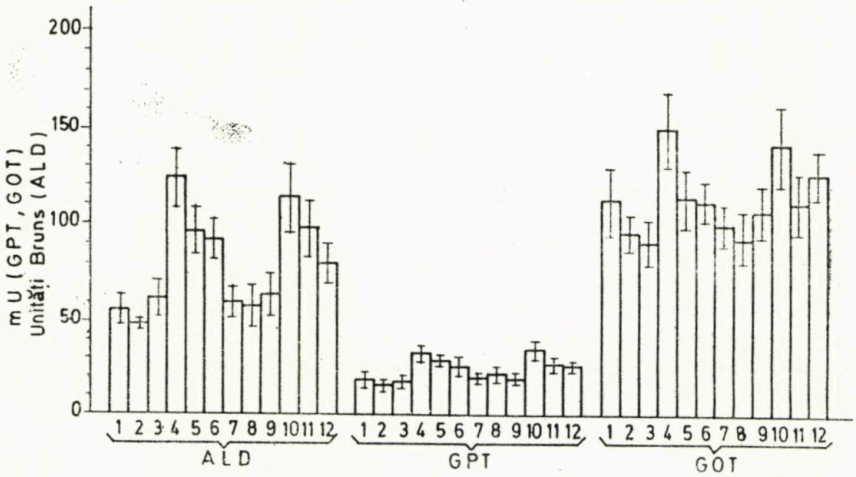


Fig. 1. — Activităţile enzimatice ale ALD, GPT şi GOT din ser în funcţie de tratamentul aplicat.

(1 : lot martor ; 2 — 12 : loturi tratate ; în cadrul fiecărui lot este figurată abaterea medie pătratică respectivă).

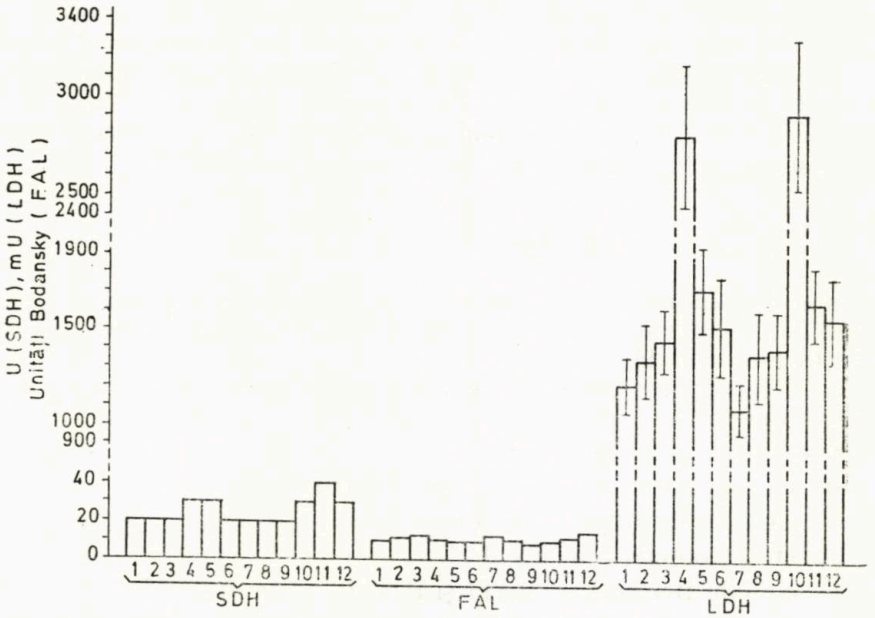


Fig. 2. — Activităţile enzimatice ale SDH, FAL şi LDH din ser în funcţie de tratamentul aplicat.

(1 : lot martor ; 2 — 12 : loturi tratate ; în cadrul fiecărui lot este figurată abaterea medie pătratică respectivă ; valorile activităţii SDH au fost multiplicate cu 10).

Cele mai importante creşteri ale activităţii enzimatice au fost constatate la animalele cărora li s-a administrat etilenglicol (lotul 4) şi la cele cu etilenglicol + citrat (lotul 10). Activitatea ALD şi GPT, enzime localizate în hialoplasmă, a crescut faţă de martor cu 121 %, respectiv 78 %. La celelalte variante cercetate (loturile 5, 6, 11, 12), adică la cele aflate sub protecţie de citrat, asociat sau nu cu etanol, creşterea activităţii enzimatice a fost mai redusă (fig. 1, 3). De reţinut că GOT, enzimă localizată concomitent în mitocondrii şi hialoplasmă, a avut o activitate uşor crescută, cu 33 %, respectiv 25 %, faţă de martor, numai la şobolanii din loturile 4 şi 10 (fig. 1, 3).

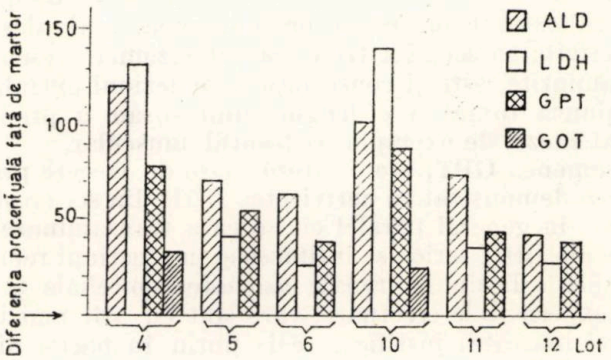


Fig. 3. — Valorile procentuale ale activităţii enzimatice (constelaţie serică : ALD, LDH, GPT şi GOT) în raport cu lotul martor.

(Săgeata indică valorile activităţii enzimatice ale lotului martor, considerate 100 %).

Activitatea LDH (hialoplasmă) a fost crescută în aceleaşi situaţii cu acelea ale ALD, cu deosebire la animalele din variantele de tratament 4 şi 10 (132 %, respectiv 141 %, peste valoarea martorilor) (fig. 2, 3). SDH şi FAL nu au avut modificări semnificative (fig. 2, 3).

Alături de datele histologice şi histochimice, rezultatele determinărilor de activitate enzimatică (fig. 1, 2, 3) confirmă prezenţa unui sindrom de citoliză hepatică aflat într-un stadiu iniţial, într-un stadiu disenergetic incipient şi reversibil, care precedă balonizarea celulei întregi.

Între componentele enzimogramei efectuate există o oarecare corelaţie, dar nu o concordanţă strînsă, deoarece la realizarea nivelului seric al unora din ele colaborează, pe lîngă factori multipli, cel puţin două organe : ficatul şi rinichiul.

Dacă caracterul toxic al leziunilor hepatice rezultă din legătura directă dintre cantitatea toxicului şi severitatea bolii [5], [6], în experimentul cronic efectuat, cu doze mici şi repetate de etilenglicol, nivelul moderat crescut (fig. 1, 3) al transaminazemiei reflectă leziuni hepatocelulare discrete. La variantele protejate faţă de acţiunea etilenglicolului, îndeosebi la lotul 12 (citrat + etanol 4 %), creşterea activităţii a fost mult mai modestă. Activitatea serică, practic nemodificată, a SDH, enzimă organ-specifică, localizată în hialoplasma celulei hepatice, indică de asemenea caracterul puţin pronunţat al leziunilor hepatocitului [2], [7].

Constelațiile serice (fig. 3) arată, pentru toate variantele experimentale în care animalele au fost tratate cu etilenglicol, asociat sau nu cu substanțe de protecție (citrat, etanol 2% și 4% și citrat + etanol 2% și 4%), că aldolazemia a fost superioară transaminazemiei și lactat-dehidrogenazemiei (ALD > GPT > LDH). Numai la variantele unde au fost constatate cele mai importante creșteri ale activității enzimatice serice (loturile 4 și 10), activitatea LDH a fost superioară aceleia a celorlalte enzime (LDH > ALD > GPT > GOT). ALD, enzimă hialoplasmică, trece ușor în afara celulei cînd membrana acesteia este lezată [2], [7]. Creșterea activității ei serice este un semn deosebit de sensibil despre existența unei leziuni celulare [2], [8] induse de noxe de diferite naturi. Nespecificitatea testului sugerează presupunerea, mai ales dacă se are în vedere și activitatea serică a GPT, că aldolazemia crescută, observată la variantele amintite, este și consecința unor leziuni extrahepatice. Este posibil ca acțiunea toxică a etilenglicolului și/sau a produșilor săi de degradare să afecteze, de exemplu, și țesutul muscular.

LDH, asemenea GPT, are o viteză mare de trecere prin membrana celulară [9]. S-a demonstrat că activitatea LDH din ser crește în leziunile celulei hepatice, în general paralel cu aceea a transaminazelor [10]. Dar valori crescute ale LDH seric se întîlnesc și în afecțiuni renale de diferite etiologii [7], [10]. Leziunile renale asociate, epiteliale și interstițiale, constatate în experiențele efectuate, care sînt cu atît mai intense cu cît litiaza este mai marcată, justifică, cel puțin în parte, nivelul crescut al LDH serice. Valorile cele mai înalte ale activității LDH serice le-am constatat într-adevăr la loturile de șobolani unde incidența intensității litiazei renale oxalice a fost cea mai mare (loturile 4 și 10). Inversarea raporturilor de creșteri procentuale ale activității enzimatice (ALD > > GPT > LDH) (fig. 3) la variantele experimentale 5, 6, 11 și 12 sugerează, de asemenea, în concordanță cu datele histologice și histochimice obținute, relativa corelație dintre intensitatea litiazei renale și nivelul LDH serice.

Mai este de amintit că activitatea serică a FAL nu a fost modificată semnificativ la nici unul din loturile de animale tratate. Au fost remarcate valori crescute ale activității acestei enzime (cu 250, 200 și 220% față de martori), numai în trei cazuri de colostază constatată histologic.

CONCLUZII

Cele mai importante creșteri ale activității enzimatice serice au fost constatate la animalele tratate cu etilenglicol, asociat sau nu cu citrat.

Datele furnizate de enzimograma efectuată sugerează prezența unor leziuni ale hepatocitului aflate într-un stadiu disenergetic incipient.

Între componentele enzimogramei nu există o strînsă concordanță, deoarece la realizarea nivelului seric al unora din ele colaborează, pe lîngă factori multipli, cel puțin două organe : ficatul și rinichiul.

Prezentat la redacție
la 3 iulie 1973

Spitalul militar central,
Laboratorul de biochimie,
București

BIBLIOGRAFIE

1. O. Macarie, D. Tănăsescu, Natalia Moldoveanu, St. cerc. biochim., **14**, 285 (1971).
2. H. U. Bergmeyer, *Methods of enzymatic analysis*, Verlag Chemie, GMBH, Weinheim/Bergstr., Academic Press, New York, London, 1965, p. 724 (a), 736 (b), 761 (c) şi 837 (d).
3. M. Bodansky, în *Biochimie medicală*, sub redacţia lui Tănăsescu Gh. şi Costescu Georgeta, Edit. didactică şi pedagogică, Bucureşti, 1966.
4. F. Wroblewski, J. S. La Due, Proc. Soc. exp. Biol. Med., **91**, 569 (1956).
5. W. S. Haubrich, *Acute liver diseases induced by chemicals and drugs*, în Bockus H. L., *Gastroenterology*, vol. III, W. S. Saunders, Philadelphia, 1966.
6. M. Cachin, *Hépatites toxiques, médicamenteuses, allergiques, et par autoimmunisation*, în *Encycl. Méd. Chir.* (*Foie*), *4*, 7015 (1965).
7. D. Amelung, *Fermentdiagnostik Interner Erkrankungen*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1964.
8. L. Heilmeyer, *Lehrbuch der speziellen Pathologischen Physiologie*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1968.
9. I. G. Batsakis, R. O. Briere, *Interpretative Enzymology*, Amer. Lect. Series. Ed. Ch. Thomas, Springfield, 1967.
10. Gh. Mogoş, *Proteinele*, Edit. medicală, Bucureşti, 1964.

THE ACTIVITY OF SOME SERUM ENZYMES IN MALE RATS WITH RENAL LITHIASIS SYNDROME INDUCED BY ETHYLENE GLYCOL

SUMMARY

The enzyme activities of aldolase, lactate dehydrogenase, sorbitol dehydrogenase, glutamicoxaloacetic and glutamicpyruvic transaminases and alkaline phosphatase were determined in serum coming from male rats treated with ethylene glycol supplemented or not with some protective compounds. In animals with lithiasic syndrome, the levels of glutamic — pyruvic transaminases, lactate dehydrogenase and aldolase along with the hystochemical data indicate the presence of some lesions of hepatocytes being on an early disenergetic stage. A certain parallelism was found between the degree of ethylene glycol degradation, between the inhibition degree of this degradation by protective compounds (citrate and ethanol) and the level of enzyme activity.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 4, 383–389 (1973)

STUDIUL COMPARATIV AL IZOENZIMELOR PEROXIDAZICE DIN SEMINȚE DE LA GENURILE *AEGILOPS* ȘI *TRITICUM*

ZOIȚA MARCU, I. BRAD și TEODORA PÎRVU

Rezumat. — Studiul comparativ al izoenzimelor peroxidazice de la unele specii ale genurilor *Aegilops* și *Triticum* arată că numărul de fracțiuni comune între speciile din seria poliploidă a acestor genuri variază între 3 și 5.
Spectrele izoenzimelor peroxidazice au prezentat o variație largă de la specie la specie, în funcție de gradul de ploidie a celor două genuri studiate.

Progresele obținute în ultimul timp în citogenetica grîului au dus la ideea revizuirii sistemului de clasificare a genului *Triticum*. Pînă nu demult, în literatura de specialitate era unanim acceptat sistemul de clasificare propus de Mac Key [1] și completat de Sears [2]. Bowden [3] a propus ca speciile genurilor *Triticum* și *Aegilops* să fie grupate într-un singur gen. Mac Key [4], [5], bazat pe studii de citogenetică, a redus numărul de specii de grîu de la 23 la 5 specii : *T. monococcum*, *T. timopheevi*, *T. turgidum*, *T. zhukowskyi* și *T. aestivum*. Morris și Sears [6] sînt de acord cu sistemul de clasificare propus de Bowden [3], cu unele completări.

În scopul de a vedea în ce măsură studiul zimogramelor poate evidenția gradul de înrudire dintre speciile diploide, tetraploide și hexaploide ale genului *Aegilops* și ale genului *Triticum*, în lucrarea de față s-au studiat comparativ spectrele izoenzimelor peroxidazice de la unii reprezentanți ai celor două genuri.

Un studiu comparativ al izoenzimelor esterazice ale genurilor *Triticum* și *Aegilops* a fost făcut recent de Nakai și colab. [7], [8], care au evidențiat o mare variație a acestor enzime la cele două genuri.

Jaaska [9], studiind izoenzimele fosfatazei acide, esterazice și peroxidazice din semințe și plăntuțe de grîu, în decursul anilor 1969, 1970 și 1971, recomandă aplicarea acestei metode în studierea relațiilor filogenetice. Într-unul din articole, Jaaska [9] face o comparație între izoenzimele mai sus amintite, din plăntuțe din specia *Aegilops*.

MATERIAL ȘI METODĂ

S-a lucrat cu semințe (recoltă 1970) din 7 specii de *Aegilops* (3 diploide, 3 tetraploide și 1 hexaploidă), obținute de la I.C.C.P.T. Fundulea, și din 40 de forme (varietăți și soiuri) aparținînd la 10 specii și 5 subspecii ale genului *Triticum*, de diferite proveniențe.

Din fiecare formă s-a mojarat cîte-un gram de seminţe cu 5 ml de tampon veronal, electroforezele lucrîndu-se după aceeaşi metodă ca şi în lucrările publicate anterior [10], [11]. Ca şi în lucrările anterioare, benzile peroxidazice migrate înspre polul pozitiv au fost notate cu +, şi cu — cele migrate înspre polul negativ. Această notare, făcută arbitrar, s-a numerotat începînd de la start.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

La cele 7 specii de *Aegilops* cercetate de noi, spectrul izoenzimelor peroxidazice diferă prin 1—5 fracţiuni.

Aegilops squarrosa L. (n = 7, genom D) are cel mai mic număr de fracţiuni (5 spre polul negativ şi 2 spre polul pozitiv).

Aegilops speltoides Tausch (n = 7, genom S) are în plus, faţă de *Aegilops squarrosa*, fracţiunea —1, ce migrează spre polul negativ.

Aegilops caudata L. (n = 7, genom C) şi *Aegilops ovata* L. (n = 14, genom C^uM°) sînt identice ca număr de fracţiuni (5 spre polul negativ şi 3 spre polul pozitiv), deosebindu-se doar prin intensitatea culorii unor benzi, în favoarea lui *Aegilops ovata*.

Aegilops crassa Boiss (n = 14, genom DM^{er}) are 6 fracţiuni ce migrează spre polul negativ şi 3 spre polul pozitiv. În comparaţie cu *Aegilops squarrosa* şi *Aegilops speltoides*, *Aegilops crassa* are în plus 3 fracţiuni izoenzimatice peroxidazice (+4, —4 şi —8), iar faţă de *Aegilops caudata* şi *Aegilops ovata* are în plus fracţiunile +4 şi —4.

Aegilops triuncialis L. (n = 14, genom C^uC), avînd acelaşi număr de fracţiuni cu *Aegilops crassa*, diferă de această specie prin lipsa fracţiunii —8 şi prezenţa fracţiunii —5 a.

Aegilops triaristata Willd (n=21, genom $C^uM^tM^{t2}$) reprezintă spectrul izoenzimatic peroxidazic cu cel mai mare număr de fracţiuni (9 spre polul negativ şi 3 spre polul pozitiv). Această specie, hexaploidă, prezintă în spectru 6 fracţiuni comune cu toate celelalte specii diploide şi tetraploide cercetate de noi, şi anume : fracţiunile +1, +2, —5 b, —6, —7 şi —9. Fracţiunile +3 şi —4 sînt comune şi cu speciile *Aegilops crassa* şi *Aegilops triuncialis*. Fracţiunea —8 este comună cu speciile *Aegilops caudata*, *Aegilops ovata* şi *Aegilops crassa*, iar fracţiunea —5 b cu speciile *Aegilops squarrosa* şi *Aegilops speltoides*.

Specia *Aegilops triaristata* (n = 21) se deosebeşte de celelalte specii prin prezenţa fracţiunii —3, care este intens colorată, iar specia *Aegilops speltoides* prin fracţiunea —1.

Rezultă că specia hexaploidă *Aegilops triaristata* însumează pe spectrul izoenzimatic peroxidazic fracţiunile de la speciile diploide şi tetraploide, avînd în plus o singură fracţiune (—3) (fig. 1).

Analiza comparativă a spectrelor izoenzimelor peroxidazice ale genului *Triticum* cu speciile *Aegilops* arată că fracţiunile +1, +2 şi —6 sînt comune speciei diploide *T. boeoticum* Boiss (donorul genomului A) (fig. 2), cît şi celor 7 specii de *Aegilops* studiate de noi. Fracţiunea —5 b, întîlnită la cele 7 specii de *Aegilops*, este comună la toate subspeciile hexaploide ale genului *Triticum*, cu excepţia unor soiuri din subspecia *vulgare* (fig. 7 şi 8). Faptul că această fracţiune (—5 b) lipseşte din spectrul

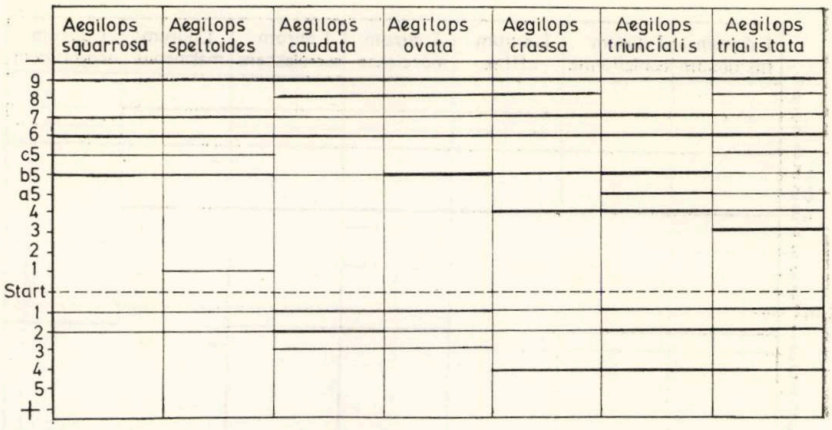


Fig. 1. — Izoenzimele peroxi lazice ale speciilor *Aegilops*.

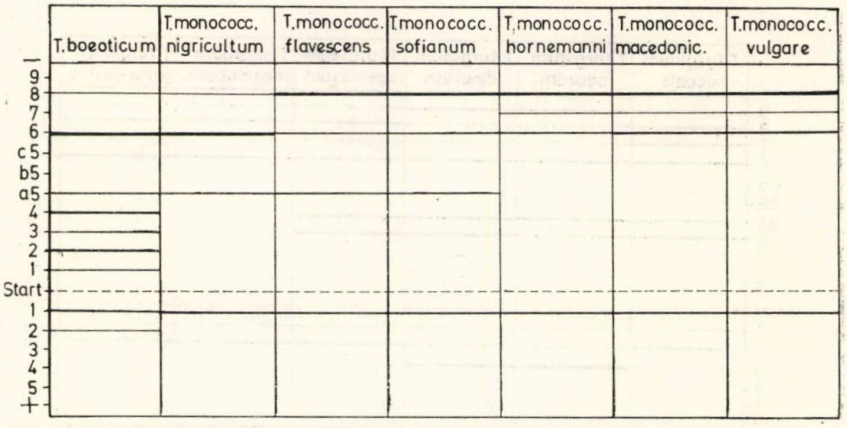


Fig. 2. — Izoenzimele peroxidazice ale speciilor diploide *Triticum boeoticum* şi *T. monococcum*.

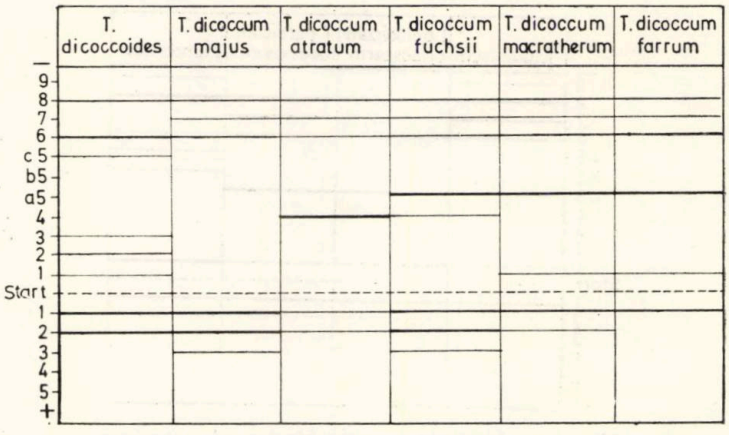


Fig. 3. — Izoenzimele peroxidazice ale speciilor *Triticum dicoccoides* şi *T. dicoccum*.

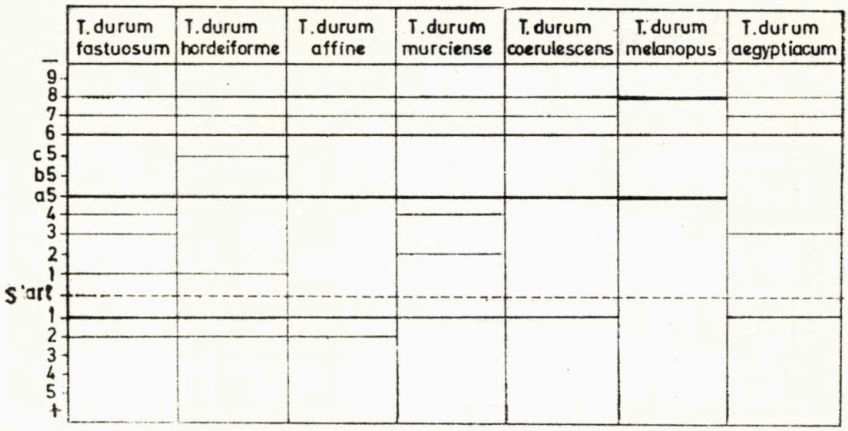


Fig. 4. — Izoenzimele peroxidazice ale speciei *Triticum durum*.

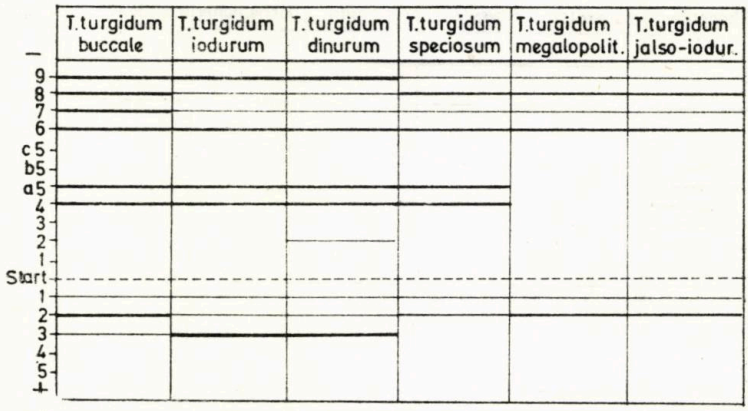


Fig. 5. — Izoenzimele peroxidazice ale speciei *Triticum turgidum*.

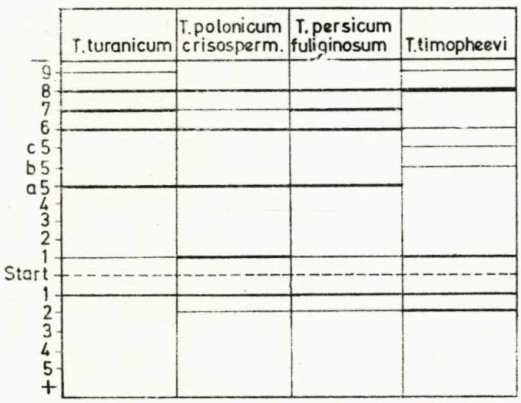


Fig. 6. — Izoenzimele peroxidazice ale speciilor *Triticum turanicum*, *T. polonicum*, *T. carthlicum* şi *T. timopheevi*.

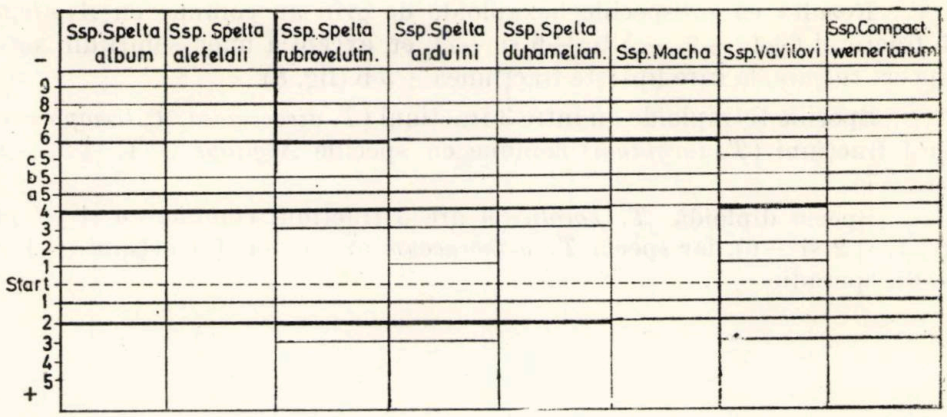


Fig. 7. — Izoenzimele peroxidazice ale subspeciilor *spelta, macha, vavilovi* şi *compactum.*

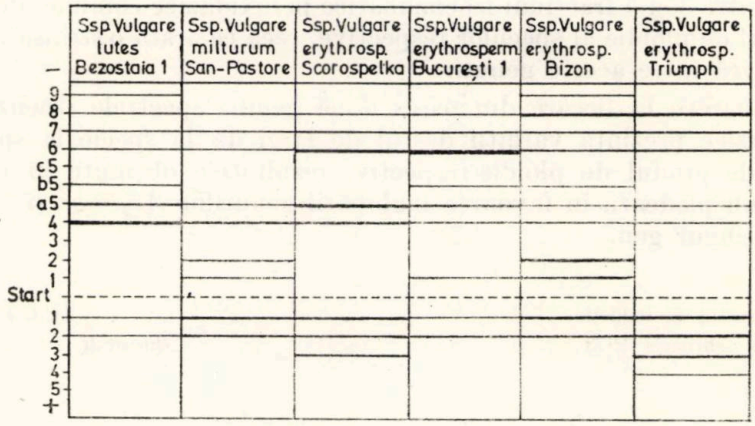


Fig. 8. — Izoenzimele peroxidazice ale subspeciilor *vulgare.*

speciilor *Triticum boeoticum* şi *T. monococcum* (genom A), precum şi din spectrul speciilor tetraploide (AB) cercetate de noi, cu excepţia speciei *T. timopheevi*, ne îndreptăţeşte să presupunem că ea a fost transmisă subspeciilor hexaploide de grîu, de la genul *Aegilops*, prin specia *Aegilops squarrosa* L. (D). Situaţie similară are şi fracţiunea —7, care e prezentă la toate cele 7 specii de *Aegilops*, cît şi la speciile tetraploide şi hexaploide de grîu, cu excepţia lui *Triticum boeoticum*, *T. dicoccoides*, *T. timopheevi* var. *melanopus* de la *T. durum* şi la 3 varietăţi din cele 7 studiate de noi : *T. monococcum* (*nigricultum, flavescens* şi *sofianum*) (fig. 2—8).

Spectrele izoenzimatice din figurile 2—8 par să confirme ipoteza că mai curînd *T. boeoticum* a fost donorul genomului A al speciilor din genul *Triticum* şi nu *Triticum monococcum.*

Fracţiunile —5 b, —5 c, —7 şi +3 au fost probabil introgresate la genul *Triticum* de la speciile genomului *Aegilops*, cu toate că fracţiunea —7 s-a găsit slab reprezentată şi la 3 varietăţi de *T. monococcum* din cele 7 studiate.

Rezultă că subspeciile hexaploide de grîu au comune cu *Aegilops* 5 fracţiuni (+1, +2, −5 b, −6 şi −7), cu excepţia unor soiuri din subspecia *vulgare*, la care lipseşte fracţiunea −5 b (fig. 8).

Speciile tetraploide au între 3 fracţiuni (*T. dicoccoides*, *T. timopheevi*) şi 4 fracţiuni (*T. turgidum*) comune cu speciile *Aegilops* (+1, +2, −6 şi −7).

Specia diploidă *T. boeoticum* are 3 fracţiuni comune cu *Aegilops* (+1, +2 şi −6), iar specia *T. monococcum* are numai 2 fracţiuni (+1 şi −6), sporadic −7.

CONCLUZII

În enzimogramele seminţelor din genurile *Aegilops* şi *Triticum* se disting între 3 şi 5 fracţiuni izoenzimatice peroxidazice comune, în funcţie de gradul de ploidie al speciilor respective, ceea ce arată o strînsă legătură filogenetică între aceste genuri.

Deoarece la fiecare din aceste două genuri spectrele izoenzimatice peroxidazice prezintă variaţii destul de largi de la specie la specie, în funcţie de gradul de ploidie respectiv, rezultatele obţinute în prezenta lucrare nu pledează în favoarea înglobării genurilor *Aegilops* şi *Triticum* într-un singur gen.

Prezentat la redacţie
la 1 februarie 1973

I.C.C.P.T.
Bucureşti — Fundulea

BIBLIOGRAFIE

1. J. Mac Key, Hereditas, **40**, 65 (1954).
2. E. R. Sears, în *Handbuch der Pflanzenzüchtung*, Paul Parey, Berlin — Hamburg, ed. a 2-a, II, 164 (1956).
3. W. M. Bowden, Canad. J. Bot. **37**, 657 (1959).
4. J. Mac Key, *Proceedings of the second international wheat genetics symposium. August 18—24 1963, Lund, Sweden*, Hereditas, supl. 2, 237 (1966).
5. J. Mac Key, *Referativnîi* J., **11**, 55 (1969).
6. R. Morris, E. R. Sears, în *Wheat and Wheat Improvement*, Am. Soc. Agron. Madison, **13**, 19 (1967).
7. Y. Nakai, T. Teramura, K. Tsunewaki, Jap. J. Genet., **44**, 259 (1969).
8. Y. Nakai, K. Tsunewaki, Jap. J. Genet., **46**, 321 (1971).
9. V. Jaaska, Acad. Nauk. Estonskoi, S S R, **18**, 170 (1969); **19**, 344, 389 (1970); **20**, 202 (1971).
10. Teodora Pîrvu, Zoiţa Marcu, I. Brad, Rev. roum. Biochim., **8**, 239 (1971).
11. I. Brad, Zoiţa Marcu, Teodora Pîrvu, Rev. roum. Biochim., **9**, 5 (1972).

COMPARATIVE STUDY OF PEROXIDASE ISOENZYMES IN SEEDS OF *AEGILOPS* AND *TRITICUM* GENERA

SUMMARY

The comparative study of peroxidase isoenzymes of certain species belonging to *Aegilops* and *Triticum* genera exhibited fraction numbers ranging from three to five, in case of species belonging to polyploid series.

Peroxidase isoenzyme spectra exhibited large variations as a function of ploidy level of the two studied genera.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 4, 391–397 (1973)

VARIAȚIA NIVELULUI ACIDULUI LACTIC ȘI A ACTIVITĂȚII LACTATDEHIDROGENAZEI DIN MUȘCHI DUPĂ PERFUZIA ACESTORA CU SOLUȚII SUPLIMENTATE CU IONI DE K^+, Ca^{2+} ȘI Mg^{2+}

C. MEDEȘAN, NATALIA MOLDOVEANU și TR. RĂDULESCU

Rezumat. — S-a urmărit, pe modelul experimental al mușchiului perfuzat cu soluții Ringer-bicarbonat suplimentate cu ioni de K^+, Ca^{2+} și Mg^{2+}, amploarea și dinamica proceselor glicolitice, efectuîndu-se dozări de acid lactic din lichidul care a irigat mușchii și paralel din omogenatele acestora, precum și determinarea activității lactat-dehidrogenazei. S-a constatat că ionii de K^+ și Mg^{2+} exercită o acțiune stimulatoare asupra glicolizei musculare, pe cînd ionii de Ca^{2+} produc o inhibare a acestui proces. Stimulările electrice ale mușchilor perfuzați cu soluții suplimentate cu ioni de Ca^{2+} determină creșteri ale nivelului acidului lactic — deci ale glicolizei — mult mai mari decît cele determinate de perfuzia cu soluții suplimentate cu ioni de K^+ sau Mg^{2+} urmată de stimulare. Se presupune că această stimulare a glicolizei ar fi datorată activării fosforilazei-*b*-kinazei de către ionii de Ca^{2+}.

Numeroase date experimentale obținute în ultimii ani au evidențiat efectele pe care unii ioni le produc asupra metabolismului celular, insistîndu-se cu precădere asupra importantului rol pe care îl au în controlul metabolic.

Dintre ionii cu acțiune marcantă din punct de vedere biologic, se detașează ionii de Na^+, K^+, Ca^{2+} și Mg^{2+}. Se știe că aceștia exercită un rol important în procesele biochimice care se petrec în mușchi, influențînd atît glicoliza, cît și respirația tisulară.

Cu toate că s-a observat de mai mult timp că ionii de Ca^{2+} inhibă glicoliza [1] — [3], în timp ce aceia de K^+ o activează [4], [5], totuși ne-am gîndit că ar fi interesant de știut ce efect are asupra glicolizei musculare perfuzia mușchilor cu soluții fiziologice suplimentate cu acești ioni, precum și cu ionii de Mg^{2+}. Am considerat că în aceste condiții s-ar putea obține indicații privitor la amploarea și dinamica proceselor glicolitice din mușchi. Dealtfel, acest studiu vine să completeze pe acelea în care s-au cercetat rolul ionilor în glicoliza musculară [6], pe de o parte, și aspecte privind procesele glicolitice din mușchii perfuzați [7] — [9], pe de altă parte, precum și efectul *in vitro* al unor ioni asupra izoenzimelor LDH [10].

MATERIAL ŞI METODE

S-a lucrat pe broaşte (*Rana ridibunda*), în greutate de 40—60 g, imobilizate prin distrugerea măduvei spinării cu 12 ore înainte de perfuzie [1].

Perfuzia muşchilor s-a făcut după tehnica lui Tredelenburg, cu modificările descrise într-o lucrare anterioară [11]. S-a utilizat pentru perfuzie soluţia Ringer-bicarbonat originală [12], suplimentată cu ioni de K^+ (a), Ca^{2+} (b) şi Mg^{2+} (c), rezultînd următoarele soluţii cu compoziţia salină exprimată în g/litru :

a) NaCl 4,80 g; KCl 0,74 g; $CaCl_2$ (anhidru) 0,11 g; $MgSO_4 7\ H_2O$ 0,246 g; $NaHCO_3$ 1,68 g (10 mM KCl, de patru ori cantitatea din Ringer originală).

b) NaCl 5,00 g; KCl 0,186 g; $CaCl_2$ (anhidru) 0,55 g; $MgSO_4 7H_2O$ 0,246 g; $NaHCO_3$ 1,68 g (5 mM $CaCl_2$, de cinci ori cantitatea din soluţia Ringer originală).

c) NaCl 4,95 g; KCl 0,186 g; $CaCl_2$ (anhidru) 0,11 g; $MgSO_4 7H_2O$ 1,20 g; $NaHCO_3$ 1,68 g (5 mM $MgSO_4$, de cinci ori cantitatea din soluţia Ringer originală).

Suplimentările cu ioni s-au efectuat scăzîndu-se din cantitatea de clorură de sodiu a soluţiei Ringer-bicarbonat originală cantităţile adăugate.

Perfuziile s-au efectuat la temperatura de 20°C, la unul din picioarele posterioare, celălalt constituind martorul neperfuzat (cu circulaţia oprită). Soluţiile de perfuzie s-au barbotat cu azot. În primele 15 min s-a efectuat perfuzia cu aproximativ 15 ml soluţie Ringer-bicarbonat, apoi aceasta s-a înlocuit cu soluţia suplimentată cu ioni, muşchii fiind irigaţi încă 30 min cu circa 35 ml soluţie. Pe toată această durată de timp s-au colectat prize de cîte 5 ml lichid de perfuzie care iriga muşchii, folosindu-se pentru aceasta cateterizarea venei abdominale a animalului. În prizele succesive de perfuzat s-a efectuat dozarea acidului lactic eliberat de muşchi în decursul experienţei.

După terminarea perfuziei s-au tăiat ambele picioare, s-au izolat muşchii gastrocnemieni, s-au îngheţat în azot lichid şi s-au mojarat. Din praful de muşchi îngheţat s-a determinat acidul lactic şi în paralel activitatea lactat-dehidrogenazei.

Pentru a evidenţia eventualele modificări care pot apărea după contracţie, am efectuat şi o variantă în care muşchiul martor, neperfuzat, a fost îngheţat în azot lichid, iar celălalt imediat după stimularea electrică. Pentru stimulare s-au utilizat pulsuri rectangulare, 2 mA, 5 imp/s, 5 ms/imp, 145 ms pauză între impulsuri, timp de 20 s.

Acidul lactic din prizele succesive de perfuzat şi din omogenatul de muşchi a fost determinat cu ajutorul metodei Barker şi Summerson [13], modificată de Hulkin şi Noble şi adaptată pentru dozarea din lichidul de perfuzie după cum s-a descris într-o lucrare anterioară [8].

Activitatea lactat-dehidrogenazei a fost determinată prin urmărirea modificării extincţiei NADH la 340 mμ [14]. S-a utilizat mediul de reacţie format din : tampon TRIS—HCl 100 mM, pH 7,5, piruvat de sodiu 0,25 mM, NADH 0,125 mM şi 0,5 mg proteină (omogenat de muşchi). Volumul total al mediului de reacţie a fost de 2 ml şi s-au efectuat citiri din minut

[1] Mulţumim chimistului Tr. Benţia pentru ajutorul tehnic acordat.

în minut, timp de 5 min. Activitatea lactat-dehidrogenazei a fost exprimată în μMoli lactat format/min/mg proteină şi raportată în procente.

Proteinele s-au determinat după metoda Lowry [15].

REZULTATE

Efluxul acidului lactic din muşchii perfuzaţi. Dozările de acid lactic eliberat în cursul perfuziei muşchilor de broască sînt redate în figura 1.

Se observă că efluxul acidului lactic, în cazul perfuziei cu soluţie Ringer-bicarbonat, variază în jurul valorii de 30 μg/ml perfuzat. Cu alte cuvinte, în repaus, toţi muşchii piciorului perfuzat produc această cantitate de acid lactic.

După introducerea în muşchi, prin perfuzie, a unei soluţii fiziologice suplimentată cu ioni de K^+, se produce o creştere mare a efluxului acidului lactic în lichidul de perfuzie, care atinge valori în jur de 300 μg/ml perfuzat. Din alura curbelor se remarcă tendinţa din ce în ce mai evidentă ca, sub influenţa potasiului, efluxul acidului lactic să rămînă mult timp la un nivel ridicat.

Perfuzia muşchilor cu soluţie Ringer-bicarbonat suplimentată cu ioni de Ca^{2+} dovedeşte că glicoliza este inhibată într-o oarecare măsură, valorile fiind sub 20 μg/ml perfuzat.

În cazul în care perfuzia s-a efectuat cu soluţie Ringer-bicarbonat suplimentată cu ioni de Mg^{2+}, se observă în primele 10 min o uşoară scădere a nivelului acidului lactic în prizele succesive de perfuzat, urmată apoi de o uşoară creştere, care însă nu depăşeşte 30 μg/ml perfuzat.

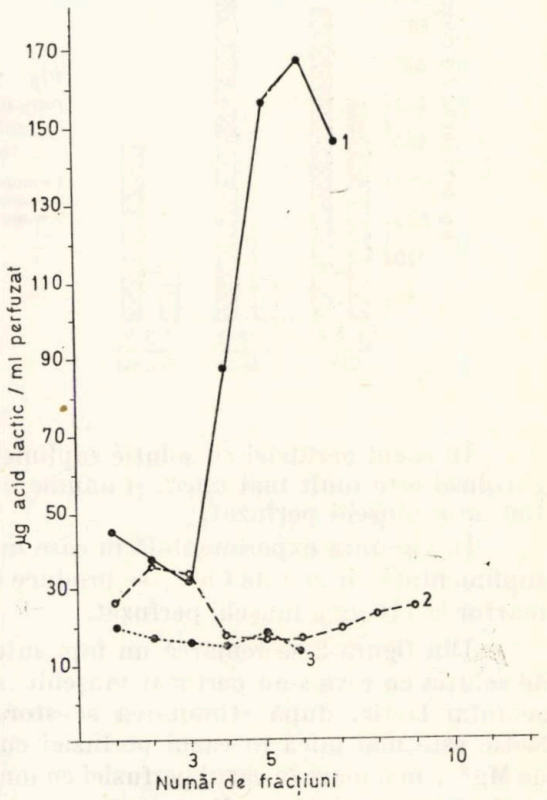


Fig. 1. —Acidul lactic eliberat de muşchi în lichidul de perfuzie.

Durata perfuziei 30 — 45 min, debitul 1 ml/min, fiecare fracţiune avînd 5 ml. Primele trei fracţiuni colectate reprezintă perfuzia cu soluţia martor (Ringer-bicarbonat barbotat cu azot). După fracţiunea a treia, soluţia Ringer s-a înlocuit cu soluţii suplimentate cu următorii ioni: 1 = K^+; 2 = Ca^{2+}; 3 = Mg^{2+}.

După tetanizări *in situ* ale muşchilor, se produce în toate cele trei cazuri, încă de la prima probă colectată, o creştere masivă a efluxului acidului lactic din lichidul de perfuzie, chiar şi în cazul cînd se utilizează soluţia suplimentată cu Ca^{2+}, care, după cum am văzut, are efecte de inhibare a glicolizei.

Nivelul acidului lactic din omogenatele muşchilor perfuzaţi. În continuarea experienţelor s-a constatat că între efluxul acidului lactic din muşchii perfuzaţi şi nivelul său intracelular există o strînsă relaţie. Astfel, din figura 2 se observă că la muşchii perfuzaţi cu o soluţie suplimentată cu ioni de K^+, se produce o creştere a nivelului acidului lactic de la 90 μg/g muşchi martor la 480 μg/g muşchi perfuzat.

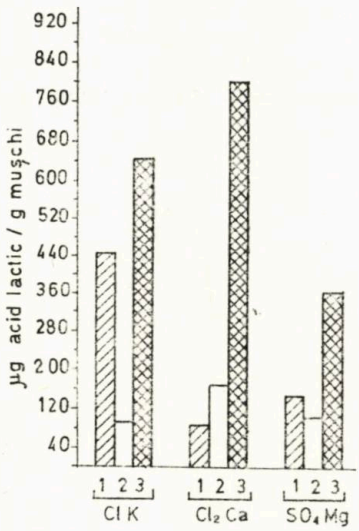


Fig. 2. — Nivelul acidului lactic din muşchii perfuzaţi aproximativ 45 min cu soluţii Ringer-bicarbonat suplimentate cu ioni şi barbotate cu azot.

1 = muşchi perfuzat cu soluţii suplimentate cu ioni;
2 = muşchi martor neperfuzat
3 = muşchi perfuzat cu soluţii suplimentate cu ioni şi stimulat electric.

În cazul perfuziei cu soluţie suplimentată cu ioni de Mg^{2+} creşterea glicolizei este mult mai mică, şi anume de la 100 μg/g muşchi martor la 150 μg/g muşchi perfuzat.

În varianta experimentală în care muşchii s-au perfuzat cu o soluţie suplimentată cu ioni de Ca^{2+}, se produce o scădere de la 160 μg/g muşchi martor la 110 μg/g muşchi perfuzat.

Din figura 2 se remarcă un fapt interesant, şi anume că, indiferent de soluţia cu care s-au perfuzat muşchii, se produce o creştere a nivelului acidului lactic, după stimularea acestora. Amploarea creşterii acidului lactic este mai mică în cazul perfuziei cu o soluţie suplimentată cu ioni de Mg^{2+}, mai mare în cazul perfuziei cu ioni de K^+ şi cea mai mare în cazul perfuziei cu o soluţie suplimentată cu ioni de Ca^{2+}.

Activitatea lactat-dehidrogenazei din omogenatele muşchilor perfuzaţi. Determinările de activitate enzimatică, efectuate pe omogenatele muşchilor perfuzaţi, au evidenţiat modificări ale activităţii LDH, în acelaşi sens cu modificările survenite în nivelul acidului lactic. Astfel, din figura 3 se observă o uşoară creştere a activităţii lactat-dehidrogenazei în muşchi perfuzaţi cu soluţie Ringer-bicarbonat suplimentată cu ioni de K^+ sau Mg^{2+} şi uşoare scăderi în urma perfuziei cu soluţia suplimentată cu ioni de Ca^{2+}.

DISCUŢII

Datele din literatură [16], [17] atestă că, în cazul muşchilor în repaus, nivelul acidului lactic se menţine scăzut. Astfel, Helmreich şi Cori [17] apreciază că nivelul de bază variază între 0,01 şi 0,03 μMoli/ml apă intracelulară/min şi acest nivel bazal redus este suficient pentru a asigura necesarul energetic al muşchiului în repaus. Formarea acidului lactic este constantă şi liniară în timp. Acidul lactic format, fiind într-o cantitate limitată, nu se produce o acumulare intracelulară şi este în acelaşi timp proporţional cu efluxul său.

Aceste constatări sînt valabile şi în cazul experienţelor noastre pe muşchi perfuzaţi. În adevăr, valorile acidului lactic din muşchii perfuzaţi cu o soluţie Ringer-bicarbonat, se păstrează în jur de 90 μg/g muşchi.

După cum s-a văzut în experienţele în care s-a dozat acidul lactic din lichidul de perfuzie, pe măsură ce acesta se produce, este deversat în lichidul care imersează muşchiul, în cantitate constantă care variază în jur de 30 μg acid lactic/ml perfuzat.

Efectele de stimulare a glicolizei produse de ionii de K^+ sau Mg^{2+}, precum şi efectul de inhibare determinat de ionii de Ca^{2+} au fost puse în evidenţă în experienţele *in vitro* atît de Bygrave [18], pe celule tumorale, cît şi în laboratorul nostru [6], pe omogenate de muşchi de broască.

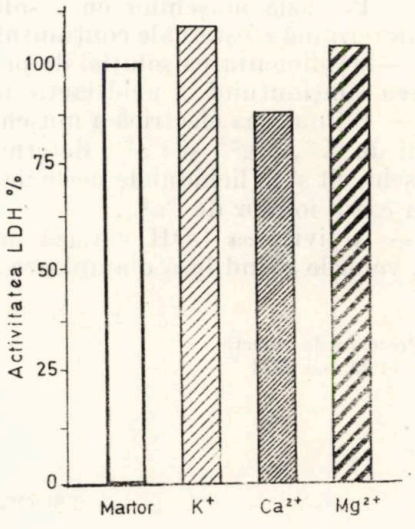


Fig. 3. — Activitatea specifică, raportată în procente, a lactat-dehidrogenazei din omogenatele de muşchi perfuzat cu soluţii Ringer-bicarbonat şi suplimentate cu ioni.

Unii autori au arătat că acţiunea acestor ioni asupra glicolizei reprezintă reflectarea efectului produs asupra unor enzime glicolitice ca fosforilaza [19], fosfofructokinaza [20 sau piruvatkinaza [21].

În experienţele noastre, în care am urmărit desfăşurarea proceselor glicolitice pe muşchi perfuzaţi, am constatat că există un oarecare paralelism între creşterea acidului lactic produsă de ionii de K^+ sau Mg^{2+} şi,

respectiv, scăderea nivelului acidului lactic realizată de ionii de Ca^{2+}, pe de o parte, şi variaţiile pe care le prezintă activitatea lactat-dehidrogenazei din omogenatele acestor muşchi, pe de altă parte.

Ceea ce merită să subliniem este efectul semnalat în cazul stimulării electrice a muşchilor perfuzaţi cu o soluţie perfuzată cu ioni de Ca^{2+}. În acest caz s-a observat că la aceşti muşchi creşterea nivelului acidului lactic este mult mai mare decît în cazul perfuziei cu o soluţie suplimentată cu ioni de K^+ sau Mg^{2+}. Or, se ştie, şi datele noastre au confirmat, că ionii de Ca^{2+} inhibă glicoliza. Stimularea glicolizei obţinută în cazul experienţelor în care am utilizat excitarea electrică, pe fondul scăzut al glicolizei determinat de perfuzia muşchilor cu soluţii suplimentate cu ioni de Ca^{2+}, s-ar putea explica prin faptul că ionii de Ca^{2+} activează fosforilaza-*b*-kinaza [22]. Această activare în cursul contracţiilor are ca efect transformarea fosforilazei *b*, formă inactivă, în fosforilază *a*, formă activă. Prin această interconversiune se modifică procentul conţinutului în cele două enzime, ceea ce duce implicit la schimbarea raportului în care coexistă în muşchi fosforilaza *a*/fosforilază *b*. Modificarea acestui raport determină, în ultimă instanţă, accelerarea glicolizei şi, implicit, creşterea cantităţii de acid lactic prezentă.

CONCLUZII

— Perfuzia muşchilor cu o soluţie suplimentată cu ioni de K^+ şi Mg^{2+} determină creşteri ale conţinutului în acid lactic din muşchi.

— Suplimentarea soluţiei de perfuzie cu ioni de Ca^{2+} are ca urmare scăderea conţinutului în acid lactic muscular.

— Stimularea electrică a muşchilor perfuzaţi cu soluţii suplimentate cu ioni de K^+, Mg^{2+} şi Ca^{2+} determină creşteri ale acidului lactic atît în muşchi, cît şi în lichidul de perfuzie ; creşterile cele mai mari sînt semnalate în cazul ionilor de Ca^{2+}.

— Activitatea LDH variază în acelaşi sens cu conţinutul în acid lactic, valorile avînd însă o amploare mult mai mică.

Prezentat la redacţie
la 22 mai 1973

Institutul „Dr. V. Babeş"
şi
Departamentul de biochimie
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. F. Dickens, G. D. Greville, Biochem. J., **29**, 1468 (1935).
2. H. McIlvain, Biochem, J., **52**, 289 (1952).
3. F. L. Bygrave, Biochem. J., **101**, 480 (1966).
4. A. Rothstein, C. Demis, Arch. Biochem. Biophys., **44**, 18 (1953).
5. A. Pena, G. Cinco, A. Gomez Puyou, M. Tvena, Biochem. biophys. Acta, **180**, 1 (1969).
6. D. Tănăsescu, Tr. Rădulescu, Tr. Benţia, Rev. roum. Biochim., **8**, 343 (1971).
7. C. Medeşan, St. crec. biochim., **11**, 173 (1968).
8. C. Medeşan, D. Tănăsescu, Rev. roum. Biochim., **7**, 215 (1970).
9. D. Tănăsescu, C. Medeşan, St. cerc. biochim., **14**, 333 (1971).

10. N. MOLDOVEANU, TR. BENŢIA, St. cerc. biochim., **16**, 153 (1973).
11. C. MEDEŞAN, Rev. roum. Biochim., **3**, 363 (1966).
12. W. F. MOMMAERTS, K. SERAYDARIAN, G. MARECHAL, Biochim. biophys. Acta, **57**, 12 (1962).
13. S. B. BARKER, W. A. SUMMERSON, J. biol. Chem., **138**, 535 (1941).
14. A. KORNBERG, în *Methods in enzymology*, ed. S. P. COLLOWICK, N. O. KAPLAN, Acad. Press, New York, 1965, vol. 1, p. 441.
15. O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, L. A. FARR, R. J. RANDALL, J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
16. J. KARLSON, Acta Physiol. Scand., 81 Supplementum, **358**, 7 (1971).
17. E. HELMREICH, C. F. CORI, în ,,Advances in Enzyme Regulation'' **III**, p. 91 (1965).
18. F. L. BYGRAVE, Nature, **214**, 667 (1967).
19. E. G. KREBS, R. H. HUSTON, F. L. HUNKELER, Advan. Enzyme Regulation, **VI**, 245 (1968).
20. D. M. REGEN, D. A. JOONG, W. W. DAWIS, J. JACK, C. R. PARK, J. biol. Chem., **239**, 381 (1965).
21. P. D. BOYER, în *The Enzyme*, ed. P. D. BOYER, H. A. LARDY, K. M. MYRBÄCH, New York, London, Acad. Press, **VI**, p. 95, 1962.
22 W. L. MEYER, E. H. FISHER, E. G. KREBS, Biochemistry, **3**, 1033 (1964).

LACTIC ACID AND LACTATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN MUSCLE FOLLOWING PERFUSION WITH SOLUTIONS SUPPLIED WITH K^+, Ca^{2+}, AND Mg^{2+} IONS

SUMMARY

The amplitude and dynamic aspect of glycolytic processes by lactic acid determination both in perfused liquid and perfused muscle homogenate as well as lactate dehydrogenase activity in muscle perfused with Ringer bicarbonate supplied with K^+, Ca^{2+} , and Mg^{2+} ions, were investigated. K^+ and Mg^{2+} ions stimulate, while Ca^{2+} ions partially inhibit, muscle glycolysis. The augmentation of lactic acid level determined by electrical stimulation of muscle perfused with solution supplied with Ca^{2+} ions is greater than that determined by electrical stimulation of muscle perfused with K^+ or Mg^{2+} ions. This effect is assumed to be due to phosphorilase-*b*-Kinase activation by Ca^{2+} ions.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 4, 399–406 (1973)

PROGRAM ETAPIZAT DE APLICARE A CONTROLULUI DE CALITATE ÎN LABORATOARELE DE CHIMIE CLINICĂ*

EUG. PĂUNESCU

Rezumat. — Controlul sistematic de calitate în laboratoarele de chimie clinică trebuie să poată aprecia acurateţea cu care se execută analizele curente. Cu ajutorul unor probe de control, cu concentraţii cunoscute, se vor stabili în prealabil, pentru fiecare metodă folosită, erorile procentuale şi se vor preciza limitele admisibile de eroare. Ulterior, probe similare de control, cu concentraţii cunoscute sau necunoscute analistului, vor fi incluse zilnic la începutul (sfîrşitul) seriilor de analize de efectuat, devenind astfel posibil să se aprecieze în fiecare zi precizia cu care se efectuează analizele curente.

Controlul asupra activităţii desfăşurate în cele mai variate domenii productive ale societăţii este astăzi general acceptat ca o necesitate şi aplicat cu rigurozitate, în forme corespunzător adaptate fiecărui sector de activitate. Pentru laboratoarele clinice, introducerea sistematică şi generalizată a controlului de calitate apare, principial, cu atît mai justificată cu cît activitatea acestor unităţi constă în analizarea conţinutului unor produse provenite de la oameni presupuşi bolnavi, ceea ce face ca — în final — de corectitudinea rezultatelor obţinute să depindă în mare măsură restabilirea sănătăţii persoanelor investigate.

Obiectivul principal al controlului de calitate în laboratorul clinic este aprecierea acurateţei cu care se fac analizele curente, cu alte cuvinte măsura în care rezultatele obţinute prin analiză se apropie de valorile reale ale constituentului determinat în produsul investigat. Această „acurateţe" a unei analize reprezintă exactitatea cu care se realizează măsurătoarea şi poate fi exprimată cantitativ prin *eroarea medie*, deci prin diferenţa dintre valoarea medie a unei serii de rezultate obţinute prin analiză şi valoarea reală a constituentului măsurat. În funcţie de mărimea acestei „erori medii", se pot lua măsuri de corectare a modului de aplicare a metodei şi — dacă este cazul — se poate hotărî chiar înlocuirea metodei folosite.

Pentru a putea aprecia eroarea pe care o realizăm cu o anumită metodă de analiză, este necesar să aplicăm această metodă la un preparat

* Raport prezentat la simpozionul U.S.S.M. asupra standardizării metodelor în laboratorul clinic (Bucureşti, iunie 1972).

ce conține o *concentrație cunoscută* [1] din componentul de testat. În acest fel vom putea calcula *eroarea* rezultatului obținut și, prin repetarea sistematică a unor astfel de determinări, putem determina o *medie a erorilor* obținute și *deviația standard* (DS) de la această medie după formula clasică

$$(1) \qquad DS = \frac{\Sigma(M - m)^2}{N - 1},$$

unde m = valorile individuale ale erorilor; M = media valorilor m; N = numărul de valori (respectiv, numărul de analize efectuate).

Valorile M $\pm$ DS obținute pot deci măsura precizia rezultatelor obținute. Aceste valori sînt însă înșelătoare pentru cazurile cînd concentrația componentului de testat este foarte joasă, deoarece — în astfel de situații — o eroare nominală redusă corespunde totuși unei erori procentuale foarte mari. Spre exemplu : dacă valoarea bilirubinei în proba de control este de 6 mg/l, atunci o eroare minimă (sub aspect tehnic) de 1 mg/l va conduce la o eroare procentuală de 16,2 %, ceea ce este mult peste limita rațional acceptabilă de $\pm$ 10 %; în schimb, în condiții similare, dacă valoarea reală a probei va fi de 80 mg/l, o aceeași eroare tehnică de 1 mg/l va însemna o eroare procentuală de numai 1,2 %.

Pentru a reliefa mai bine efectul nivelului concentrației de substanță testată asupra valorii erorilor procentuale, în tabela 1 sînt figurate 5 cazuri în care s-a realizat o aceeași eroare nominală (de 10 mg/100 ml), dar în condiții de concentrații inițiale variate.

Din exemplele prezentate în tabela 1 rezultă că, pentru aprecierea acurateței unei metode, este mult mai semnificativă estimarea erorilor procentuale (*eroarea* %) decît aceea a erorilor nominale.

Pe de altă parte, se ridică în mod firesc întrebarea : cît poate să fie de mare o eroare procentuală pentru a oferi totuși determinărilor efectuate

Tabela 1

Efectul concentrației asupra valorii erorilor procentuale, în condițiile unei erori nominale constante

Proba nr.	Valori reale	Valori obținute	Eroarea nominală (mg/100 ml)	Eroare procentuală
1	25	35	+10	+40 %
2	50	60	+10	+20 %
3	100	90	−10	−10%
4	200	210	+10	+ 5 %
5	300	290	−10	− 3,3 %

limitele de siguranță dorite, cunoscînd că aceste limite trebuie să asigure în ultimă instanță diferențierea între valorile normale și cele patologice? Sub aspect statistic asta înseamnă a stabili — pentru fiecare metodă în parte — anumite limite de variație a erorilor, în așa fel încît cel puțin

[1] Asemenea preparate, mai ades cunoscute sub denumirea de „etaloane de referință", sînt astăzi larg utilizate în practică [1], [2]. Ele sînt preparate și pe scară industrială, fiind puse în comerț sub diferite denumiri : Versatol (Warner-Chilcott Labs, Ontario), Calibrate (Précibio), Biotrol (Paris), Biochemica (Boehringer, Mannheim) etc.

95 % din rezultatele obţinute să asigure constant diferenţierea între normal şi patologic. Reamintim că 95 % dintr-o serie de date normal distribuite corespunde valorii M $\pm$ k (DS), unde k este un factor definit de gradele de libertate N — 1 ale seriei şi tinde către 2 atunci scînd N $\geqslant$ 31, aşa cum se observă în tabela 2. Şi cum în cazul controlului calităţii analizelor biochimice ceea ce interesează este variaţia erorilor procentuale, înseamnă

Tabela 2

Valorile lui „k" pentru diferite grade de libertate* exprimate prin N — 1 (unde N este numărul de determinări) (după Henry şi Dryer, 1963) [3]

N — 1	*k*	N — 1	*k*	N — 1	*k*
1	12,71	10	2,23	25	2,06
3	3,81	15	2,13	30	2,04
5	2,57	20	2,09	35	2,03

* În egalitatea 95% = $M \pm k$ (DS)

că problema se reduce la determinarea, pentru fiecare metodă testată, a limitelor admisibile de eroare în care să se încadreze dublul coeficientului de variaţie al erorilor procentuale ($\pm$ 2 CV %), definit cu ajutorul deviaţiei standard :

$$\pm 2\,CV\,\% = \frac{2\,DS}{M} \times 100. \qquad (2)$$

Dacă utilizarea coeficientului $\pm$ 2 CV ne permite să apreciem cu rigurozitate suficientă încadrarea rezultatelor între anumite limite de eroare, rămîne de precizat modalitatea de stabilire a acestor „limite admisibile de eroare" (LAE). Există în prezent o opinie destul de larg răspîndită că, pentru determinările biologice, o eroare de $\pm$ 10 % este obişnuită. În practică, însă, unde obiectivul principal al determinărilor de chimie clinică este să se diferenţieze normalul de patologic, se constată că limitele de eroare de $\pm$10 % nu pot fi generalizate şi la cazurile — relativ frecvente — în care domeniul normal are valori fie prea mari, fie prea mici. Spre exemplu :

a) În cazul clorurilor sanguine — pentru care domeniul de normal este între 98 şi 108 mM/l —, dacă se folosesc LAE de $\pm$10 %, atunci nu vom putea deosebi valoarea perfect normală de 102 mM/l de o valoare subnormală de 96 mM/l (deoarece pentru valoarea subnormală va rezulta un domeniu de eroare de 86—106, superpozabil în mare măsură cu domeniul de eroare 92—112 care rezultă pentru valoarea normală).

b) În cazul creatininemiei [2] — al cărei domeniu normal este între 8 şi 15 mg/l — aplicarea LAE de $\pm$10 % ar da, pentru valoarea de 10 mg/l, un domeniu de eroare foarte strîns, de 9—11 mg/l, ceea ce sub aspect tehnic este deosebit de greu de atins în condiţiile unor analize curente.

Pentru aceste motive, nu se poate recurge la soluţia f acilă de a adopta în mod generalizat LAE de $\pm$10 %.

Pentru stabilirea unor LAE acceptabile, s-au făcut propuneri de către diverşi autori [4] — [6]; dintre aceste sugestii, formula generală

[2] Ca şi în cazul bilirubinemiei ori al fosfatazei acide serice.

de calculare a LAE propusă de Tonks [7] apare mai rațională, deoarece ține o mai bună diferențiere a valorilor anormale de cele normale în zonele de margine ale domeniului normal. Conform acestei formule,

$$\text{LAE } \% = \frac{\pm 1/4 \text{ din domeniul normal}}{\text{media domeniului normal}} \times 100,$$

ceea ce pentru proteinele serice înseamnă

$$\text{LAE } \% = \frac{\pm 1/4\,(8{,}2 - 6{,}2)}{7{,}2} \times 100 = \frac{\pm 0{,}5 \times 100}{7{,}2} = \pm 7\%,$$

iar pentru potasemie

$$\text{LAE } \% = \frac{\pm 1/4\,(5 - 3{,}5)}{4{,}25} \times 100 = \frac{\pm 0{,}375 \times 100}{4{,}25} = \pm 8{,}8\%.$$

Totuși, așa cum de altfel a constatat și autorul [8], formula generală propusă trebuie să sufere unele ajustări — în plus sau în minus — pentru o serie de cazuri la care posibilitățile tehnice ale metodelor uzuale asigură condiții de mai mică sau mai mare sensibilitate decît LAE calculate. În tabela 3 sînt rezumate principalele modificări ce trebuie aduse LAE calculate după formula Tonks.

Tabela 3

Limitele admisibile de eroare (LAE) pentru principalele componente serice de testat (calculate după formula Tonks și modificate în funcție de condițiile tehnice uzuale de lucru)

Componenții de testat	Valori calculate ale LAE	LAE modificate
Proteine totale	± 7%	± 7%
Ionii potasiu și bicarbonat	± 8,8%	± 8,8%
Calciu	± 5,0%	± 6%
Clorul și sodiul	± 2,35%	± 4%
N ureic	±17,0%	±12%
Bilirubina, colesterolul, creatinina, glucoza *, fosforul, acidul uric	±12...33%	±10%
Amilaza, fosfatazele, transaminazele, LDH	±21...30%	±20%

* Determinarea pe singe total.

Cu aceste ajustări, formula Tonks devine operantă.

★

Dacă datele expuse referitor la limitele admise de eroare și la calcularea coeficientului de variație a erorilor procentuale permit definirea cadrului statistic care asigură controlul acurateții determinărilor efectuate în

laboratoarele de chimie clinică, urmează precizarea *condiţiilor concrete de aplicare a controlului de calitate* care să folosească parametrii statistici expuşi.

În acest sens, cercetările întreprinse în laboratorul nostru ne-au arătat că este preferabil ca introducerea propriu-zisă a controlului de calitate să fie precedată de o fază preliminară, care să verifice precizia metodelor folosite. Această fază preliminară are drept scop să asigure *selecţionarea unor metode suficient de sensibile*, care să corespundă obiectivelor laboratorului clinic; totodată, ea trebuie *să permită substituirea LAE prin limitele* ± 2 CV % stabilite pe baza unor verificări experimentale.

Faza preliminară trebuie să înceapă prin consemnarea în scris, cu toate amănuntele necesare, a tehnicii de lucru pentru metoda aleasă, a modului de preparare a reactivilor, a gradului de puritate a substanţelor folosite. Se stabilesc concomitent şi LAE pentru tehnica respectivă, ţinîndu-se seama de domeniul normalului pentru componentul ce trebuie testat (v. tabela 3). Odată precizate toate detaliile protocolului de lucru, acesta va fi aplicat exact aşa cum a fost hotărît; orice alte modificări ulterioare se vor face numai de şeful laboratorului, ca urmare a unor motivări temeinice. Orice modificare decisă se va consemna în protocol.

Se prepară apoi *probe de control*, ale căror valori vor fi *cunoscute* de tehnicianul ce aplică metoda. Valorile probei de control cunoscute vor corespunde concentraţiei medii din domeniul normalului pentru componentul ce urmează a fi determinat [3]. Cîte o asemenea probă de control va fi inserată printre produsele de testat de două ori pe zi: o dată la începutul seriei de analize şi a doua oară la sfîrşitul seriei. Aceste probe vor fi supuse la absolut toate etapele tehnicii de lucru, în conformitate cu protocolul stabilit. În acest mod se va proceda zilnic, timp de 16 zile lucrătoare, obţinîndu-se la sfîrşitul perioadei de experimentare un număr de 32 de rezultate.

Pentru fiecare rezultat obţinut se va calcula abaterea procentuală de la valoarea *cunoscută* a probei de control şi aceste erori procentuale vor fi înscrise — zilnic — într-o diagramă de tipul celei din figura 1 (în care sînt marcate LAE %).

Analiza acestei diagrame se face zilnic şi, în cazul că se observă o dublă eroare peste LAE, se repetă analiza din ziua respectivă (exemplificare în fig. 1). De obicei, asemenea erori au loc datorită unui defect de manipulare, folosirii unor pipete imperfect calibrate etc., defecte care sînt uşor identificabile şi imediat remediabile. În alte cazuri (exemplificare

[3] Spre exemplu, în cazul determinării glicemiei, proba de control va conţine 0,8 g glucoză *anhidră* în 1 l soluţie de acid benzoic saturat; pentru proteine se va folosi o soluţie de albumină serică bovină cristalizată 72 g/l etc. În cazul bilirubinei, creatininei şi anumitor sisteme enzimatice (fosfataza acidă spre exemplu), va trebui să se folosească în probele de control concentraţii mult peste limitele normalului, pentru motivele expuse anterior. Cele mai bune probe de control sînt acelea formate din amestecuri de seruri umane (rămase de la analizele curente), la care s-au determinat cu precizie valorile diferiţilor componenţi de testat. Asemenea seruri se distribuie în mici cantităţi, în flacoane perfect închise şi se păstrează congelate (5).

în fig. 2), se poate observa o tendință — constant repetată — de a se înregistra erori mari, care ating sau chiar depășesc limitele admisibile de eroare; în aceste cazuri este obligatorie o revizie atentă a protocolului de lucru sau chiar renunțarea la metoda respectivă și înlocuirea ei cu alta mai precisă.

La sfîrșitul celor 16 zile ale fazei preliminare controlului, cu ajutorul celor 32 de erori procentuale obținute pentru proba de control examinată

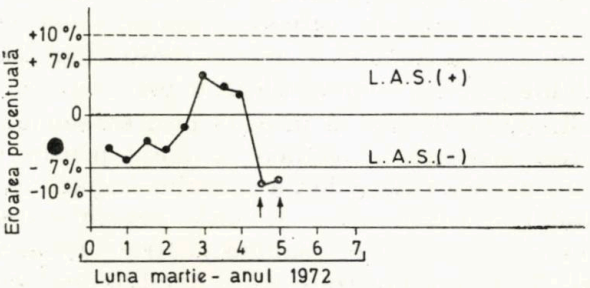


Fig. 1. — Înregistrarea grafică a erorilor obținute în cazul determinării proteinelor serice totale pe probe de control cu valori cunoscute (metoda cu reactiv biuret). Săgețile indică o dublă eroare (depășind LAE % stabilită) datorită utilizării unor pipete necorespunzătoare.

se va calcula coeficientul de variație a erorilor procentuale. Valorile obținute vor fi marcate apoi pe grafic (fig. 1) și *vor deveni limitele admisibile de eroare pentru controlul de calitate propriu-zis*, instituit în etapa imediat următoare.

În felul acesta, controlul de calitate va putea fi efectuat pe *metode de lucru verificate* în prealabil, cărora *li s-au fixat LAE % la nivelul ± 2 CV* determinate experimental, în condițiile particulare de lucru ale laboratorului respectiv.

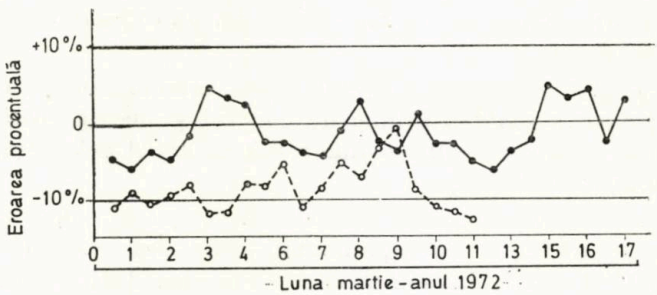


Fig. 2. — Înregistrarea grafică a erorilor procentuale obținute în cazul determinării proteinelor serice totale pe probe de control cu valori cunoscute, folosind două metode diferite: linia continuă marchează erorile obținute prin utilizarea metodei cu reactiv biuret, iar linia punctată erorile obținute prin metoda spectrofotometrică (se poate observa că metoda spectrofotometrică duce în mod constant la valori mai reduse).

Controlul de calitate propriu-zis poate fi executat după un protocol similar cu cel descris pentru faza preliminară. De asemenea, și în cadrul controlului de calitate evidențierea unei erori care depășește LAE %

(respectiv ± 2 CV%) va necesita luarea unor măsuri imediate pentru identificarea și eliminarea cauzei de eroare.

În funcție de gradul de dotare cu aparatură, cadre etc. a laboratorului, ca și în funcție de numărul și complexitatea analizelor efectuate, este recomandabil să se aducă anumite îmbunătățiri protocolului pentru controlul de calitate propriu-zis, și anume :

1) Probele de control zilnic să fie constituite din diferite serii separate, cu valori distincte, dintre care : *una* să corespundă concentrației medii a domeniului de normal, *a doua* concentrației imediat superioare normalului și *a treia* concentrației imediat inferioare normalului[4]. Alegerea unor asemenea valori pentru controlul de calitate va permite o verificare a modului de lucru și pentru concentrațiile limită ale domeniului de normal, zone deosebit de importante pentru diferențierea normalului de patologic.

2) *Valorile reale* ale probelor de control *să nu fie cunoscute* de către tehnicianul care execută analiza, ca să se poată realiza condiții riguroase pentru un control eficace al calității activității desfășurate.

★

În concluzie, controlul de calitate — a cărui introducere în toate laboratoarele clinice este o necesitate stringentă — trebuie să constituie o acțiune organizată, care să cuprindă zilnic toate metodele de analiză în funcțiune. Acest control are drept scop evidențierea mărimii erorilor de măsurare survenite în cursul analizelor de rutină și, în acest sens, trebuie să se efectueze cu probe de control care — avînd concentrația componentului de testat cunoscută — permit aprecierea diferenței dintre rezultatul obținut și valoarea reală, deci permit calcularea erorilor procentuale realizate în cursul aplicării fiecărei metode. Pe baza unui număr de cel puțin 31 de determinări efectuate pe o aceeași probă de control, se poate aprecia statistic coeficientul de variație a erorilor procentuale pentru fiecare metodă în parte, în condițiile de lucru particulare ale unui anumit laborator. Devine astfel posibil să se stabilească limitele reale de eroare ce survin în practica zilnică, urmînd ca aceste „limite admisibile de eroare" să constituie criteriul hotărîtor al controlului de calitate instituit.

Sistemul de control de calitate pe care-l propunem presupune deci două faze complementare, etapizate în timp :

a) *o fază preliminară*, de verificare a preciziei metodelor alese pentru lucru, în cadrul căreia se va determina experimental și coeficientul de variație a erorilor procentuale, urmînd ca valorile acestuia să desemneze limitele admisibile de eroare pentru controlul de calitate ce se va aplica ;

b) *faza controlului de calitate propriu-zis*, în cadrul căreia — cu ajutorul metodelor verificate și al LAE (± CV%) stabilite experimental în faza preliminară — se va verifica zilnic acuratețea modului de lucru, folosind în acest scop probe de control multiple, cu valorile cunoscute sau necunoscute tehnicianului ce practică analiza.

Ambele faze sînt accesibile și este indispensabil să fie aplicate în fiecare laborator clinic. Însă, în timp ce faza preliminară este aceeași

[4] În acest sens, în cazul controlului de calitate pentru determinările de glicemie se pot folosi probe de control cu următoarele concentrații : 0,8 g/l ; 1,05 g/l și 0,55 g/l.

pentru toate tipurile de laboratoare, faza controlului de calitate propriu-zis poate fi aplicată diferenţiat, de la un tip de laborator la altul. Astfel:

— pentru laboratoarele mici, cu dotare minimă şi cadre reduse, poate fi acceptată utilizarea zilnică a unei singure probe de control, cu valoare cunoscută tehnicianului ce execută analiza;

— pentru laboratoarele mai mari, cu dotare bună şi cadre mai numeroase, este de dorit utilizarea zilnică a unor probe de control multiple, dintre care unele cu valori necunoscute tehnicianului ce execută analiza;

— în sfîrşit, pentru laboratoarele cu dotare completă şi personal numeros, utilizarea probelor de control multiple şi cu valori necunoscute analistului devine obligatorie.

Aplicarea controlului de calitate presupune instituirea unei evidenţe corecte şi zilnice pentru toate rezultatele obţinute. Modul de întocmire a acestei evidenţe — atît prin fişe, cît şi prin diagrame pentru fiecare tip de analiză şi fiecare analist în parte — este preferabil să fie stabilit pe plan central, pentru a fi uniform.

De asemenea, tot pe plan central este bine să se realizeze diversele probe de control care vor servi pentru realizarea controlului de calitate în laboratoarele clinice de pe întreg teritoriul ţării, pentru a se asigura atît omogenitatea testelor de control, cît şi exactitatea conţinutului preparatelor folosite drept probe de control.

Prezentat la redacţie
la 2 iulie 1973

Institutul de fiziologie,
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. R. N. Barnett, A. D. Cash, Amer. J. clin. Path., **52**, 457 (1969).
2. R. G. Hoffman, *New methods for surveying clinical laboratories*, Coral Gables Publ., Florida, 1967.
3. R. J. Henry, R. L. Dayer, în *Standard methods of clinical chemistry*, **4**, Academic Press, New York, 1963.
4. T. P. Withehead, L. O. Morris, Ann. clin. Biochem., **6**, 94 (1969).
5. E. J. Hendriks, E. F. Freier, Postgrad. Med., **40**, A—70 (1969).
6. J. V. Straumfjord, B. E. Copeland, Amer. J. clin. Path., **44**, 252 (1965).
7. D. B. Tonks, Clin. Chem., **9**, 217 (1963).
8. D. B. Tonks, Intern. Symp. on statistical quality control in analytical laboratory, Z. anal. Chem., **243**, 760 (1968).

A PROGRESSIVE PROGRAMME FOR QUALITY CONTROL IN CLINICAL CHEMISTRY LABORATORIES

SUMMARY

A systematical quality control in clinical chemistry laboratories should be capable of appreciating the accuracy of the performed analyses. By means of some appropriate reference samples of known concentration of the substance (known control samples), it will be established the percentage error for each method, and set up the allowable limits of error. Then, similar control samples, of known or unknown concentration, will be daily included at the beginning (the end) of each sample series intended to be analyzed. Thus, it becomes possible to appreciate if the daily measurements are correct enough.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 4, 407—410 (1973)

VARIAȚII ÎN COMPOZIȚIA CHIMICĂ A ULEIULUI VOLATIL DIN FRUCTE DE *AMORPHA FRUTICOSA* L.

HONORIUS POPESCU, CLARA OPFERMANN și VETURIA POP

Rezumat. — Fructele de salcîm mic, *Amorpha fruticosa* L., recoltate în diferite puncte ale Transilvaniei, au dat naștere, prin antrenare cu vapori de apă, la 0,95—1,27 ml ulei volatil la 100 g material vegetal lipsit de umiditate, în care au fost identificate : amorfen, limonen, α-pinen, β-pinen și semnalate pentru prima oară : acetat de linalil, borneol, 1,8-cineol, linalool și terpineol. Prin cromatografie pe strat subțire se constată că spoturile de acetat de linalil, 1,8-cineol și terpineol au fost prezente, singure sau asociate, numai în unele eșantioane de ulei volatil.

Plantă nord-americană, *Amorpha fruticosa* L. aparține familiei *Leguminosae* Juss., subfamilia *Papilionatae* Aschers.

În Europa și Asia este cultivată mai ales ca element de consolidare pe pantele abrupte ale terasamentelor de șosele și căi ferate, pe terenuri degradate, în perdele de protecție sau în garduri vii, ca plantă meliferă și ornamentală. Aclimatizîndu-se total în zonele sudice ale Europei și Asiei, a devenit subspontană.

Specia este un arbust lemnos, înalt de 1—3 m, care lăstărește abundent, fapt pentru care a primit numele de *A. fruticosa*, adică cea plină de mlădițe. Caracterele frunzelor imparipenat-compuse, cu 11—25 foliole, i-au atras denumirile românești de salcîm mic și acăț fără ghimpi. Fructele sînt păstăi brune, de 8—9 mm lungime și 1 mm lățime, verucoase, ușor curbate, incluzînd cîte una sau, mai rar, două semințe netede, brun-verzui [1].

Triturate la mojar, fructele mature prezintă o aromă asemănătoare cu parfumul frunzelor de lămîi și mușcată. Gustul lor este particular, lăsînd în urmă o senzație de ușoară anestezie [2].

Din datele publicate pînă în prezent rezultă că fructele de salcîm mic, de diferite proveniențe, au dat la distilare cu vapori de apă cantități cuprinse între 0,35 și 1,9 ml ulei volatil la 100 g material vegetal lipsit de umiditate [3] — [5].

S-au determinat și constantele fizico-chimice ale uleiului volatil, dintre care : $d_{20}^{20} = 0{,}8995$ [4], respectiv 0,9053—0,9160 [3] și 0,9162—0,9180 [6], $n_D^{20} = 1{,}4938 - 1{,}4979$ [3], respectiv 1,5032 [7] și $\alpha_D = +5°88'$ pînă la $+15°70'$ [3] sau inactiv [7].

În uleiul volatil au fost identificate cantități mici de hidrocarburi monoterpenice : α-pinen, β-pinen, camfen, mircen, limonen, γ-terpinen,

p-cimen, iar dintre sesquiterpene : amorfen, humulen, curcumen, calamenen [8] şi cadinen [7], [8].

Primele cercetări întreprinse asupra uleiului volatil din fructe de proveniență românească în intenţia eventualei evaluări ca materie primă pentru industria preparatelor igieno-cosmetice şi chimico-farmaceutice arătau un conţinut de 1,27 ml ulei volatil la 100 g fructe lipsite de umiditate, cu $d_{20}^{20} = 0{,}89978$ şi $n_D^{20} = 1{,}49964$. Dintre componentele sale, s-au identificat prin cromatografie pe strat subţire şi în fază gazoasă : amorfen, limonen, α-pinen şi β-pinen, semnalîndu-se totodată prezenţa unor alcooli terapeutici : borneol, linalool şi terpineol [2].

În elaborarea acestei lucrări s-a pornit de la observarea unor diferenţe în compoziţia chimică a mostrelor de ulei volatil obţinut din fructe recoltate de la mai multe populaţii româneşti de *Amorpha fruticosa* L.

MATERIAL ŞI METODĂ

S-au colectat fructe de *Amorpha fruticosa* L., detaşate de pe axul racemului, din recoltele anilor 1970—1972, de la populaţii identificate în mai multe locuri din patru judeţe ale Transilvaniei : Alba, Cluj, Hunedoara şi Satu-Mare.

După o prealabilă mărunţire a fructelor, uleiul volatil din fiecare probă a fost extras prin distilare cu vapori de apă în sistem închis, cu un aparat neo-Clevenger de tipul Otto Moritz [9].

Studiul diferitelor eşantioane de ulei volatil astfel obţinute s-a făcut prin cromatografie pe strat subţire. În acest scop s-au utilizat plăci de sticlă de 200 × 100 mm, acoperite cu Kieselgel G MERCK, formula Stahl, 6 g suspendate în 12 ml apă distilată şi activate la 110° timp de 30 minute. Din probele de ulei volatil s-au preparat soluţii cloroformice 0,1 : 10 v/v, aplicîndu-se cîte 0,20 ml pentru constituirea fiecărui punct de start. Developarea s-a făcut la 22° ±1°C, utilizînd ca fază mobilă amestecul de o. xilen cu acetat de etil 80 : 20 v/v în atmosferă nesaturată [10]. Pentru relevare, plăcile au fost pulverizate cu soluţie de vanilină 2 % în acid sulfuric concentrat v/v [11] şi supuse încălzirii la 100°C timp de 6—8 minute. Examinarea plăcilor s-a făcut la lumina zilei, după ce au fost lăsate la aer timp de 2—4 ore de la încălzire. Pentru identificarea amorfenului, relevarea s-a făcut pe alte plăci, pulverizînd succesiv anhidridă acetică şi acid sulfuric concentrat [2].

REZULTATE ŞI INTERPRETARE

Fructele provenite din cele 10 mostre recoltate în diferite puncte ale Transilvaniei au dat la distilare cu vapori de apă cantităţi procentuale diferite de ulei volatil, cuprinse între 0,95 şi 1,27 ml la 100 g fructe lipsite de umiditate (tabela 1).

Uleiul volatil obţinut s-a prezentat, în toate cazurile, ca un lichid transparent, foarte slab verzui sau gălbui, cu miros intens şi persistent, amintind pe acela al fructelor de *Amorpha fruticosa* L. şi avînd o uşoară nuanţă de miros de pin.

Relevarea cromatogramelor a condus la evidențierea spoturilor unui număr de 9 componente, dintre care 6 prezente în mod constant în toate cele 10 eșantioane numerotate de la I la X.

Tabela 1

Locurile recoltării și cantitățile procentuale de ulei volatil obținut din fructe de *Amorpha fruticosa* L.

Nr. mostrei	Locul recoltării	Ulei volatil extras ml/100 g fructe anhidre
I	Aiud — Terasa Căprioara, jud. Alba	1,13
II	Ardud, jud. Satu-Mare	1,14
III	Cluj — Grădina botanică, jud. Cluj	0,95
IV	Cluj — grădina Facult. farmac. jud. Cluj	1,07
V	Gelmar — malul Mureșului, jud. Hunedoara	1,17
VI	Jucu — terasamentul c.f., jud. Cluj	1,27
VII	Mirăslău — drumul național 1 jud. Alba	1,06
VIII	Pui — drumul național 66 jud. Hunedoara	0,95
IX	Tîrgușor — drumul comunal jud. Cluj	0,95
X	Turda — drumul național 1 jud. Cluj	1,15

Tabela 2

Valorile Rf și frecvența diferitelor spoturi în cromatogramele realizate cu ulei volatil de *Amorpha fruticosa* L.

Valorile Rf și componentele	Proba nr.									
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
0,90 — 1,00 amorfen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,60—0,76 acetat de linalil	—	+	—	+	—	+	—	—	+	+
0,61—0,66 limonen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,55—0,60 1,8-cineol	—	+	—	+	—	—	+	—	—	+
0,49—0,54 neidentificată	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,44—0,49 linalool	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,38—0,43 borneol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,34—0,38 neidentificată	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,29—0,34 terpineol	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+

Spoturile de acetat de linalil, 1,8-cineol și terpineol au fost puse în evidență numai în unele probe, după cum se vede în tabela 2.

Constatarea permite clasificarea mostrelor de ulei volatil analizate în 4 grupe, la care se reprezintă astfel populațiile de *Amorpha fruticosa* L. luate în studiu:

1. ulei volatil cu 1,8-cineol, provenit de la populația de *Amorpha fruticosa* L. identificată la Mirăslău, jud. Alba;

2. ulei volatil cu terpineol, provenit de la populaţiile de *Amorpha fruticosa* L. identificate la Aiud, jud. Alba, Cluj — Grădina botanică, Gelmar şi Pui, jud. Hunedoara ;
3. ulei volatil cu acetat de linalil şi terpineol, provenit de la populaţiile de *Amorpha fruticosa* L. identificate la Jucu şi Tîrguşor, jud. Cluj ;
4. ulei volatil cu acetat de linalil, 1,8-cineol terpineol, provenit de la populaţiile de *Amorpha fruticosa* L. identificate la Ardud, jud. Satu-Mare, Cluj — grădina Facultăţii de farmacie şi Turda, jud. Cluj.

Verificarea persistenţei acestor diferenţe pe o perioadă mai lungă de timp ar putea conduce la definirea taxonilor chimici ai speciei, corespunzători grupelor caracterizate.

Prezentat la redacţie
la 23 iunie 1973

Disciplina de farmacognozie,
Facultatea de farmacie
Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. * * * *Flora Republicii Populare Române*, vol. V, Edit. Academiei, Bucureşti, 1957.
2. C. Opfermann, V. Pop, H. Popescu, Bulet. şt. stud. (Agr. — Med. — Farm.), 265—268 (1972).
3. E. Gheorghiev, C. R. Acad. Bulg. Sc. **15**, 491 (1962) ; Tr. Sci. Inst. Techn. Sup. Ind. Alim. Plovdiv, **10**, 305 (1963).
4. M. Smodlaka, P. Lukić, S. Simić, Acta Pharm. Jugosl., **7** (2), 111 (1957).
5. P. Toleva, Tr. Sci. Inst. Techn. Sup. Ind. Alim. Plovdiv, **12** (1), 179 (1965) ; **12** (2), 105 (1965).
6. P. G. Topalov, S. A. Ivanov, E. Gheorghiev, Tr. Sci. Inst. Techn. Sup. Ind. Alim. Plovdiv, **9**, 87 (1962).
7. Y. Shinosaki, K. Koshino (1918, 1919) — cit. E. Gildemeister, F. Hoffmann, *Die ätherischen Öle*, Bd. V, Akademie-Verlag, Berlin, 1959.
8. O. Motl, M. Romańuk, V. Herout, Collect. czechoslov. chem. Comm. **31**, 2025 (1966).
9. * * * *Farmacopeea română*, ed. a VIII-a, Edit. medicală, Bucureşti, 1965.
10. H. Popescu, Teză de doctorat, Inst. Med. Farm. Cluj, 1971.
11. M. Luckner, *Prüfung von Drogen*, Gustav Fischer-Verlag, Jena, 1966.

VARIATIONS OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF THE ESSENTIAL OIL FROM THE FRUIT OF *AMORPHA FRUTICOSA* L.

SUMMARY

The fruits of *Amorpha fruticosa* L collected from various points of Transilvania, yielded by water steam distillation 0.95 — 1.27 ml of essential oil/100 g dry vegetal material.

In the essential oil there were identified : amorphene, limonene, α-pinene and for the first time : linalyl acetate, borneol, 1,8-cyneol, linalool and terpineol.

Thin layer chromatography showed the presence of the spots for linalyl acetate, 1,8-cyneol and terpineol alone as associated only in some of the essential oil samples.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 4, 411–418 (1973)

INFLUENȚA IONULUI DE CESIU ASUPRA CONȚINUTULUI ÎN ACID LACTIC ȘI APĂ TOTALĂ ȘI ASUPRA EXOSMOZEI ACIDULUI LACTIC DIN MUȘCHIUL GASTROCNEMIAN DE BROASCĂ

LORA SCOLNIC

Rezumat. — Ionul de Cs^+ introdus în mediul de imersie al mușchiului gastrocnemian de broască produce o scădere semnificativă a conținutului lui în apă totală, proporțională cu creșterea concentrației de CsCl din mediu. Cs^+ determină la mușchi de dimensiuni mai mici o scădere evidentă a conținutului lor în acid lactic. Scăderea conținutului în acid lactic, la mușchii de dimensiuni mai mari, este observată doar la cea mai mare concentrație de CsCl studiată. Efectul Cs^+ asupra glicolizei musculare este similar celui produs de K^+. Acțiunea ionului Cs^+ asupra permeabilității membranei este contrară aceleia a ionului K^+; în timp ce acesta din urmă mărește, cel dintîi micșorează permeabilitatea membranei pentru acidul lactic.

De la descoperirea lui Ringer, în 1883 [1], că K^+, Rb^+ și, într-un grad mai mic, Cs^+ au efecte asemănătoare asupra ventriculului de broască, o serie de autori au studiat efectele substituirii K^+ cu Cs^+, folosindu-l ca trasor al K^+ [2] — [4], sau au urmărit pe mușchiul scheletic acumularea Cs^+ în celulă [5] — [7]. Alții au comparat permeabilitatea membranei musculare pentru K^+ și Cs^+ [8].

Relman și colab. [9], hrănind șobolani tineri cu cantități echivalente de K^+ și Cs^+, au observat că aceste elemente sînt regăsite în țesuturi, Cs^+ acumulîndu-se în mușchi în concentrație mai mare decît K^+. O substituție cantitativ importantă și prelungită a K^+ cu Cs^+ nu este compatibilă cu o creștere normală a animalelor, care, datorită efectelor toxice pe care Cs^+ le exercită asupra inimii și mușchiului scheletic [10], sucombă cînd aproape jumătate din K^+ muscular este înlocuit cu Cs^+.

Experiențele pe mușchi izolați de broască sugerează că înlocuirea totală a K^+ cu Cs^+ este totuși posibilă, mușchii păstrîndu-și proprietățile funcționale timp îndelungat [5]. Reținerea Cs^+ în țesutul muscular depinde de activitatea fiziologică [11], de concentrația în Na^+ [12], ca și de tipul mușchiului [13].

Numeroase lucrări arată că, deși ionii de Cs^+ trec prin membrana musculară cu viteză mult redusă față de aceea a ionilor de K^+ [14] — [16], specificitatea de membrană pentru acești ioni este destul de asemănătoare pentru ca ei să prezinte efecte competitive în timpul intrării lor în celulă [17] — [19].

Efectele ionului de Cs^+ asupra țesuturilor excitabile le amintesc pe acelea ale K^+ [15]. Totuși, o serie de autori au semnalat diferențe specifice între efectele acestor ioni asupra multor procese în celulele musculare [20] — [23].

Lucrarea de față își propune să urmărească dacă ionul de Cs^+ introdus în mediul de imersie determină, la mușchiul gastrocnemian de broască, modificări comparabile cu cele ale K^+ [24] în ceea ce privește glicoliza și permeabilitatea membranei musculare pentru acidul lactic.

MATERIAL ȘI METODE

Experiențele au fost efectuate pe broaște (*Rana ridibunda*). După amputarea simultană a picioarelor posterioare, mușchii gastrocnemieni au fost izolați cu atenție, evitîndu-se lezarea, tamponați ușor cu hîrtie de filtru, cîntăriți apoi și imersați în soluțiile corespunzătoare.

La martor mușchii au fost imersați în 12 ml sol. Ringer—Jendrassick [25], conținînd la litru 6,5 g clorură de sodiu, 0,2 g clorură de potasiu, 0,2 g clorură de calciu și 0,1 g bicarbonat de sodiu.

În vederea studierii efectului ionilor de Cs^+, în diferite concentrații, mușchii erau introduși în soluție Ringer care, în locul KCl, conținea CsCl, în concentrație de 10, 20 și 50 mM/l, ceilalți constituenți rămînînd în concentrațiile menționate mai sus.

Imersarea mușchilor s-a făcut pentru perioade diferite de timp. În prima variantă, pentru a avea condiții comparabile cu ale ionului de K^+ [24], s-a ales timpul de 3 ore și jumătate, iar în altă variantă, dat fiind că pătrunderea Cs^+ în celulele musculare are loc cu viteză mult redusă față de aceea a K^+ [14], timpul de imersare a fost prelungit la 5 ore și jumătate. Tot timpul imersării, soluțiile au fost barbotate continuu și uniform cu un curent de oxigen. La intervale de aprox. 20 minute, conținutul vasului se agita ușor.

La sfîrșitul perioadei de imersare, mușchii scoși din soluțiile Ringer corespunzătoare au fost imediat tamponați ușor pe hîrtie de filtru, mărunțiți, cîntăriți, apoi omogenizați la rece, într-un omogenizator Potter, cu 7 ml acid tricloracetic 10 %. Extractul tricloracetic a fost apoi centrifugat la 4500 ture/min, timp de 15 minute. Pentru dozarea acidului lactic, efectuată după metoda Barker și Summerson [26], s-au folosit 2 ml supernatant.

S-au determinat atît conținutul în acid lactic al mușchiului, cît și cantitatea difuzată în soluția de imersie, pentru ca însumarea celor două valori să reflecte cantitatea totală de acid lactic. Pentru dozarea acidului lactic în soluție de imersie s-au folosit 8 ml. Rezultatele au fost exprimate în mg/100 g mușchi umed, cînd ne-am referit la conținutul mușchilor în acid lactic, iar valorile pentru acidul lactic exosmozat sînt exprimate în μg/mușchi.

Pentru determinarea de apă totală, mușchii au fost imersați în aceleași condiții ca la determinarea acidului lactic, iar apa s-a determinat gravimetric, prin cîntăriri diferențiale, înainte și după uscare pînă la greutate constantă și s-a exprimat în g/g substanță uscată.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Într-o lucrare anterioară [24] am pus în evidenţă faptul că muşchii simetrici ai aceleiaşi broaşte conţin cantităţi aproape egale de acid lactic şi pierd, prin exosmoză, cantităţi practic egale din acest acid. Acest fapt a permis să se urmărească, pe acelaşi animal, influenţa exercitată de ionul Cs^+ asupra glicolizei, ca şi asupra permeabilităţii membranei musculare pentru acidul lactic.

Din datele trecute în tabela 1 se constată că muşchii gastrocnemieni imersaţi în soluţie Ringer-Jendrassick care, în locul KCl, conţine cantităţi de CsCl cuprinse între 10—50 mM/l au un conţinut mai mic de apă totală decît muşchii martor imersaţi în soluţie Ringer-Jendrassick. Deshidratarea muşchilor este practic proporţională cu creşterea concentraţiei de CsCl în mediul de imersie.

Tabela 1

Conţinutul în apă totală al muşchilor gastrocnemieni de broască imersaţi în soluţie Ringer-Jendrassick cu adaos cantităţi diferite de CsCl

C = muşchi tratat cu CsCl
M = muşchi martor

	Greutatea muşchilor g		Concentraţia CsCl mM/l	Apă totală g/g substanţă uscată		Diferenţa g/g substanţă uscată
	M	C		M	C	C — M
	0,30	0,32	10	4,36	4,28	—0,08
	0,30	0,29	10	4,06	3,96	—0,10
	0,32	0,35	10	4,19	3,98	—0,15
	0,37	0,35	10	4,05	3,96	—0,09
Media	0,32	0,33		4,16	4,06	—0,10
	0,40	0,42	20	4,63	4,48	—0,15
	0,47	0,48	20	4,40	4,20	—0,20
	0,46	0,44	20	4,78	4,60	—0,18
	0,37	0,40	20	5,17	4,95	—0,22
Media	0,42	0,43		4,74	4,55	—0,19
	0,50	0,45	50	4,42	3,93	—0,49
	0,50	0,52	50	4,61	4,12	—0,49
	0,48	0,46	50	4,56	3,88	—0,68
	0,51	0,53	50	4,91	4,44	—0,47
Media	0,50	0,49		4,62	4,09	—0,53

Menţionăm că Briner şi colab. [27] nu găsesc modificări de volum la muşchii sartorius de broaşte *Buffo* imersaţi în soluţie Ringer cu adaos de CsCl. Rezultatele noastre concordă însă cu cele publicate de unii autori după care cantitatea apei totale este dependentă de osmolaritatea mediului înconjurător [28], [29].

Din tabela 2 se observă că prezența în lichidul de imersie a CsCl în concentrație de 20, respectiv 50 mM/l, lăsat să acționeze timp de 3 ore și jumătate asupra mușchilor, nu afectează conținutul în acid lactic al mușchilor. În schimb, exosmoza acestui acid este scăzută în comparație

Tabela 2

Conținutul și exosmoza acidului lactic la mușchii gastrocnemieni de broască imersați timp de 3 ore și jumătate în soluție Ringer-Jendrassick cu adaos de cantități diferite de CsCl

C = mușchi tratat cu CsCl
M = mușchi martor

Greutatea mușchilor g		Concentrația CsCl mM/l	Acid lactic în mușchi µg/g țesut umed		Acid lactic exosmozat µg/ mușchi		Acid lactic din mușchi + acid lactic exosmozat µg/mușchi	
M	C		M	C	M	C	M	C
0,70	0,68	20	420	400	110	81	404	352
0,62	0,60	20	550	560	69	45	410	381
0,73	0,75	20	650	640	77	63	551	541
0,65	0,70	20	380	370	92	71	339	330
Media 0,67	0,64		500	492	87	64	421	401
0,80	0,82	50	580	570	120	90	584	557
0,65	0,63	50	630	640	89	72	498	475
0,70	0,70	50	470	450	63	50	392	365
0,85	0,83	50	580	560	54	30	547	495
Media 0,74	0,75		565	555	81	58	505	475

cu cea a mușchiului martor. Însumînd cantitatea acestui acid din mușchi cu cea exosmozată, se obține la sfîrșitul experienței micșorarea cantității totale de acid lactic, în comparație cu a mușchiului martor. În evaluarea rezultatelor am avut în vedere modificarea în greutate a mușchilor, sub influența concentrațiilor respective de CsCl.

Tabela 3 arată că mușchii de dimensiuni mici, imersați o perioadă mai îndelungată — 5 ore și jumătate —, prezintă, la toate concentrațiile studiate, o scădere evidentă a conținutului în acid lactic. Exosmoza acestuia este de asemeni scăzută. Scăderea cantității de acid lactic difuzat întrece cu mult scăderea concentrației sale intense, ceea ce pledează pentru scăderea semnificativă a permeabilității membranei musculare.

Scăderea conținutului în acid lactic al mușchiului, observată după o perioadă de imersare mai îndelungată decît în cazul obținerii aceluiași efect sub influența ionilor de K^+ [24], s-ar datora pătrunderii mai lente în mușchi a ionilor de Cs^+ față de cei de K^+ [14] — [16].

Este de menționat că, pe mușchi de dimensiuni mai mari, cantitatea de acid lactic se micșorează abia la concentrația maximă de CsCl folosită în experiențele noastre (50 mM/l), fapt care s-ar explica prin pătrunderea mai intensă în mușchi a ionilor de Cs^+ în funcție de concentrația lor externă [30].

Diferenţa de comportare între muşchii mici sau mari, chiar la aceeaşi perioadă de imersare, s-ar datora faptului că echilibrul de schimb ionic se atinge mai repede în muşchii de dimensiuni mai mici [31]. În schimb,

Tabela 3

Conţinutul şi exosmoza acidului lactic la muşchii gastrocnemieni de broască imersaţi, timp de 5 ore şi jumătate, în soluţie Ringer-Jendrassick cu adaos de cantităţi diferite de CsCl

C = muşchi tratat cu CsCl
M = muşchi martor

Greutatea muşchilor g		Concentraţia CsCl mM/l	Acid lactic în muşchi µg/g ţesut umed		Acid lactic exosmozat µg/muşchi		Acid lactic din muşchi + acid lactic exosmozat µg/muşchi	
M	C		M	C	M	C	M	C
0,40	0,40	10	380	300	48	37	200	162
0,34	0,35	10	810	680	63	20	338	258
0,40	0,42	10	760	610	98	60	402	316
0,40	0,38	10	580	490	70	38	302	220
Media 0,39	0,37		630	520	65	38	310	239
0,42	0,45	20	360	200	182	89	333	200
0,48	0,46	20	550	490	64	20	328	245
0,48	0,48	20	420	310	92	26	294	175
0,35	0,33	20	860	640	38	16	339	227
Media 0,43	0,43		550	410	94	38	324	212
0,34	0,35	50	770	600	63	25	324	229
0,43	0,44	50	810	680	80	30	428	329
0,40	0,42	50	900	610	70	43	437	298
0,47	0,45	50	930	550	40	18	457	265
Media 0,40	0,40		850	610	63	29	410	280

permeabilitatea membranei musculare este afectată în ambele cazuri în acelaşi sens (tabelele 3, 4), evidenţiindu-se o scădere semnificativă a ei pentru difuzia acidului lactic în mediul înconjurător.

Rezultatele noastre diferă de cele obţinute de Müller şi colab. [32], care observă stimularea glicolizei musculare. Diferenţele s-ar putea datora faptului că autorii menţionaţi au lucrat în alte condiţii experimentale, şi anume în prezenţa ca substrat a glucozei.

Datele cuprinse în această lucrare arată că efectul ionului Cs^+ asupra glicolizei musculare este similar celui produs de K^+, cu modificarea în sens invers a permeabilităţii. În timp ce K^+ măreşte [24], Cs^+ micşorează semnificativ permeabilitatea membranei musculare pentru acidul lactic.

Menţionăm că o serie de lucrări au semnalat efecte diferite ale ionilor de K^+ şi Cs^+ şi în ceea ce priveşte efluxul Na^+ şi consumul de oxigen [20], ca şi răspunsul membranei musculare la acetilcolină şi colină [21] — [23].

S-ar putea ca efectul toxic atribuit ionului Cs^+ să fie legat de scăderea permeabilităţii membranei musculare, cel puţin în cazul acidului lactic, pusă în evidenţă în lucrarea de faţă, întrucît micşorarea ionilor de Ca^{2+}, al căror rol în impermeabilizarea membranei celulare este cunoscut [33], ca şi prezenţa celor de K^+, care măresc permeabilitatea membranei muscu-

Tabela 4

Conținutul și exosmoza acidului lactic la mușchii gastrocnemieni de broască imersați, timp de 5 ore și jumătate în soluție Ringer-Jendrassick cu adaos de cantități diferite de CsCl

C = mușchi tratat cu CsCl
M = mușchi martor

	Greutatea mușchilor g		Concentrația CsCl mM/l	Acid lactic în mușchi µg/g țesut umed		Acid lactic exosmozat µg/mușchi		Acid lactic din mușchi + acid lactic exosmozat µg/mușchi	
	M	C		M	C	M	C	M	C
	0,74	0,75	10	550	540	120	90	527	495
	0,57	0,60	10	440	450	68	60	310	330
	0,70	0,65	10	760	680	55	40	587	484
	0,62	0,60	10	350	330	88	62	305	260
Media	0,65	0,66		520	500	83	63	434	392
	0,65	0,63	20	450	440	280	104	572	381
	0,65	0,71	20	490	450	52	20	370	344
	0,85	0,87	20	690	710	103	60	692	678
	0,61	0,60	20	530	500	83	48	406	438
Media	0,69	0,70		540	530	124	58	510	438
	0,71	0,70	50	430	300	52	39	357	249
	0,60	0,60	50	930	690	45	25	603	439
	0,60	0,61	50	550	420	120	90	450	346
	0,59	0,62	50	470	320	68	19	343	217
Media	0,62	0,63		540	390	71	43	438	313

lare pentru acidul lactic [24], conduc la mărirea timpului de supraviețuire a cordului de broască țestoasă perfuzat cu Cs-Ringer [34], [35]. Studii ulterioare vor încerca să elucideze și acest aspect.

CONCLUZII

1. Ionul de Cs^+ introdus în mediul de imersie al mușchiului gastrocnemian de broască determină o scădere semnificativă a conținutului acestuia în apă totală, proporțională cu creșterea concentrației de CsCl din mediu.

2. La mușchii de dimensiuni mici, ionul de Cs^+ determină o scădere evidentă a conținutului lor în acid lactic.

3. Scăderea conținutului în acid lactic la mușchii de dimensiuni mai mari este observată doar la cea mai mare concentrație de CsCl studiată, respectiv 50 mM/l.

4. Indiferent de durata de imersare și de mărimea mușchilor, Cs^+ provoacă o scădere semnificativă a permeabilității membranei pentru acidul lactic.

5. Efectul Cs^+ asupra glicolizei musculare este similar celui produs de K^+, ceea ce denotă că efectul K^+ nu este specific.

6. Acţiunea ionului de Cs^+ asupra permeabilităţii membranei este contrară aceleia a ionului K^+; în timp ce acesta din urmă măreşte, cel dintîi micşorează permeabilitatea membranei musculare pentru difuzia acidului lactic în mediul înconjurător.

Prezentat la redacţie la
29 mai 1973

Institutul de ştiinţe biologice,
Departamentul de biochimie
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. S. Ringer, J. Physiol., **4**, 370 (1883).
2. R. Kilpatrick, H. E. Reuschler, D. S. Munro, G. M. Wilson, J. Physiol., **133**, 194 (1956).
3. M. P. Tyor, J. S. Eldridge, Amer. J. Med. Sci., **232**, 186 (1956).
4. S. L. Hood, C. L. Comar, Arch. Biochem. Biophys., **45**, 423 (1953).
5. M. Lubin, P. B. Sneider, J. Physiol., **138**, 140 (1957).
6. A. S. Relman, A. T. Lambie, A. M. Roy, B. A. Burrow, Clin. Res. Proc., **4**, 150 (1960).
7. J. C. Colin, J. Stolkowski, Ann. Endocrin., **24**, 538 (1963).
8. R. H. Adriani, J. Physiol., **169**, 16 P (1963).
9. A. S. Relman, A. T. Lambie, A. Belton, J. clin. Invest., **36**, 1249 (1957).
10. R. H. Follis, Jr., Amer. J. Physiol., **138**, 246 (1943).
11. L. Ekman, W. Greitz, *Radioecological Concentration Processus*, Pergamon Press, London — New York, 1968, p. 65.
12. L. A. Beaugé, R. A. Sjodin, J. Physiol., **194**, 105 (1968).
13. R. P. Kernan, J. Physiol., **204**, 195 (1969).
14. E. J. Conway. P. T. Moore, Nature, **156**, 170 (1945).
15. R. A. Sjodin, J. gen. Physiol., **24**, 983 (1959).
16. R. A. Sjodin, L. A. Beaugé, Science, **156**, 1248 (1967).
17. R. A. Sjodin, J. gen. Physiol., **44**, 929 (1961).
18. G. N. Ling, M. M. Ochsenfeld, J. gen. Physiol., **49**, 819 (1966).
19. G. N. Ling, J. Physiol. Med., **34**, 89 (1955).
20. A. Portela, J. C. Perez, M. Luchelli, P. A. Stewart, H. Hajduk, M. Parisi, A. Garison, Biochim. biophys. Acta, **109**, 495 (1965).
21. A. Portela, J. C. Perez, P. Stewart, Nature, **199**, 8150 (1963).
22. A. Portela, J. C. Perez, M. Luchelli, P. Stewart, Nature, **203**, 1071 (1963).
23. A. Portela, J. C. Perez, M. Luchelli, P. Stewart, Nature, **203**, 1179 (1964).
24. L. Scolnic, St. cerc. biochim., **15**, 289 (1972).
25. L. Jendrassick, J. Faiszt, Rolando Eötvos nominatae, Sect. Biol., **1**, 133 (1957).
26. S. B. Barker, W. A. Summerson., J. biol. Chem., **138**, 535 (1941).
27. G. P. Briner, S. E. Simon, R. Frater, P. Tasker, Biochim. biophys. Acta, **35**, 485 (1959).
28. V. I. Stabrovskaia, N. M. Nastretayeva, A. D. Brown, Citologia, **9**, 1137 (1970).
29. Y. N. Natschin, Zh. Obsch. Biol., **27**, 473 (1966).
30. M. Guerin, G. Wallon, C. R. Soc. Biol., **163**, 313 (1969).
31. R. D. Keynes, Proc. roy. Soc., B., **142**, 359 (1954).
32. M. Müller, S. E. Simon, Biochim. biophys. Acta, **37**, 107 (1960).
33. A. M. Shanes, Pharmacol. rev., **10**, 59, (1958).
34. M. Guerin, G. Wallon, C. R. Soc. Biol.,**164**, 966 (1970).
35. M. Guerin, G. Wallon, C. R. Soc. Biol., **163**, 1324 (1969).

THE EFFECT OF CESIUM IONS UPON LACTIC ACID AND TOTAL WATER CONTENT AS WELL AS UPON LACTIC ACID EXOSMOSIS IN FROG GASTROCNEMIUS MUSCLE

SUMMARY

Cesium ions introduced in the imersion medium of frog gastrocnemius muscles induce a significant decrease in the total water content of muscles proportional to the increase in cesium chloride concentration. Cs^+ produces to muscles of smaller size an evident decrease in lactic acid content. At muscles of greatest size the decrease in lactic acid is observed only at the greatest cesium chloride concentration studied. The effect of Cs^+ upon glycolysis is similar to that produced by K^+. The action of Cs^+ on membrane permeability is contrary to that of the K^+ : K^+ increases, while Cs^+ decreases the permeability of the muscle membrane for lactic acid.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 4, 419–427 (1973)

CORELAȚII ÎNTRE DIFERITE CĂI ALE METABOLISMULUI GLUCIDIC ÎN CONDIȚIILE INHIBIȚIEI METABOLICE CU MALONAT

MIHAIL ȘERBAN și MARGARETA ȘERBAN

Rezumat. — În condițiile afectării fluxului normal al ciclului acizilor tricarboxilici prin inhibiție competitivă cu malonat, căile metabolismului glucidic prezintă anumite modificări în celula hepatică, care pot reflecta posibilități de adaptare metabolică. Se prezintă o serie de caracteristici pe care le manifestă activitatea și modelele izoenzimatice ale unor enzime ca: hexokinaza (glucokinaza și formele moleculare cu K_m mic față de substrat), lactat-dehidrogenaza, glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza și glucozo-6-fosfataza.

Raportul activităților glucokinază/hexokinaze cu K_m mic față de substrat scade semnificativ în inhibiția cu malonat; acesta determină, de asemenea, o depresare a activităților lactat-dehidrogenazei și glucozo-6-fosfat-dehidrogenazei, cu modificarea concomitentă a modelelor izoenzimatice respective. Activitatea glucozo-6-fosfatazei este semnificativ crescută, ceea ce presupune o activare a procesului gluconeogenetic.

Într-o lucrare anterioară [17] am abordat unele aspecte referitoare la modificările „adaptative" ale metabolismului glucidic la nivelul ficatului prin cercetarea corelației dintre glicoliză și gluconeogeneză, în condițiile lezării hepatocitului prin intoxicare acută cu tetraclorură de carbon. S-au descris o serie de caracteristici pe care le prezintă activitatea și modelele izoenzimatice ale unor enzime implicate în cele două căi de reacții opuse — glicoliza și gluconeogeneza. Totodată, s-a subliniat faptul că efectul exercitat de către tetraclorura de carbon se manifestă mai pregnant asupra fluxului metabolic gluconeogenetic decît asupra celui glicolitic [15], [16].

Ca o continuare a acestor cercetări, ne-am propus să abordăm unele aspecte ale modificărilor metabolismului glucidic în condițiile acțiunii unor inhibitori metabolici. S-a încercat astfel realizarea unor „leziuni biochimice", respectiv enzimopatii experimentale, prin administrarea — *in vivo* — a unor inhibitori specifici, ca: fluorura de sodiu (inhibitor al glicolizei la nivelul enolazei), malonatul de sodiu (inhibitor competitiv al succinat-dehidrogenazei la nivelul ciclului acizilor tricarboxilici) și azida de sodiu (inhibitor al transferului de energie în cadrul lanțului de respirație celulară).

Cercetarea efectului exercitat de acțiunea acestor inhibitori asupra unor enzime implicate în diferite căi ale metabolismului glucidic se bazează pe premisa că cele două căi de reacții opuse — glicoliza și gluconeogeneza — sînt, în ultimă instanță, reglate de activitatea enzimelor-cheie ale fiecărui

lanţ în parte, adică a acelor enzime care prezintă viteza de reacţie cea mai mică, îşi exercită activitatea catalitică într-un singur sens şi acţionează ca factori limitanţi ai unui întreg lanţ metabolic [14], [18], [21], [22]; conform concepţiilor actuale, investigarea unor enzime dintr-o cale metabolică, respectiv comportarea acestora în raport cu anumiţi efectori, poate fi generalizată asupra întregului genom [14], [20].

Pe de altă parte, efectul exercitat de anumiţi inhibitori, în condiţiile impuse celulei de acţiunea lor, s-ar putea manifesta asupra reglării fluxului metabolic al glucozo-6-fosfatului, metabolit de la care diverg diferitele căi ale metabolismului glucidic. De aceea, cercetarea corelaţiei dintre unele enzime aparţinînd căilor glicolitică, gluconeogenetică şi pentozofosfat poate reflecta orientarea, într-un sens sau altul, a desfăşurării reacţiilor metabolice, respectiv preponderenţa unora din aceste căi pentru metabolizarea glucozo-6-fosfatului.

În scopul abordării aspectelor menţionate, am recurs la cercetarea unor enzime „adaptative", şi anume: hexokinaza (2.7.1.1), respectiv glucokinaza (2.7.1.2), ca enzimă unidirecţională a catenei glicolitice, glucozo-6-fosfataza (3.1.3.9), ca enzimă unidirecţională a gluconeogenezei, precum şi lactat-dehidrogenaza (1.1.1.27), ca enzimă bidirecţională comună atît glicolizei, cît şi gluconeogenezei. La studiul acestor enzime am asociat şi glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza (1.1.1.49) — enzimă a şuntului pentozic. Totodată, ne-am propus cercetarea corelaţiei dintre enzimele menţionate şi sub aspectul comportării formelor moleculare multiple ale acestora, plecînd de la premisa că eventuale modificări la nivelul modelelor izoenzimatice ar putea reflecta posibilităţi de adaptare a metabolismului, în funcţie de efectul indus de către diferite tipuri de inhibitori.

În această lucrare se prezintă datele obţinute în condiţiile afectării ciclului acizilor tricarboxilici prin administrare — *in vivo* —de malonat, respectiv efectul acestui inhibitor asupra diferitelor căi ale metabolismului glucidic.

MATERIAL ŞI METODE

Model experimental. Cercetările s-au efectuat pe ţesutul hepatic provenit de la un număr de 16 iepuri masculi (Chinchilla), în greutate medie de 2250 g, ţinuţi în regim alimentar normal. Unui lot i s-a administrat prin injecţii intraperitoneale o doză de 25 mg/kg corp de malonat de sodiu, la intervale de 30 min, timp de 2 ore, realizîndu-se astfel un model experimental de tip acut. Unui al doilea lot, luat ca referinţă, i s-a injectat, în acelaşi ritm, soluţie fiziologică. Animalele au fost sacrificate la 30 min de la ultima injecţie. De la ambele loturi s-a recoltat ţesutul hepatic, care, în prealabil, a fost supus controlului histologic. În paralel, au fost prelevate şi probe de sînge, în vederea efectuării determinărilor enzimatice.

Extracţia enzimelor hepatice. Ficatul a fost în prealabil spălat în mod repetat cu ser fiziologic, tamponat cu hîrtie de filtru şi cîntărit. Omogenizarea ţesutului s-a făcut într-o baie de gheaţă, cu ajutorul unui omogenizator de tip Potter. Extracţia enzimelor s-a efectuat în soluţii tampon diferite şi în rapoarte diferite, astfel încît să se realizeze pentru fiecare enzimă condiţia optimă de determinare.

Hexokinazele s-au extras în tampon glicocol-EDTA-Mg^{2+} 23 mM de pH 7,0 [3], raportul de extracție fiind de 1/6 greutate/volum.

Lactat-dehidrogenaza s-a extras în tampon TRIS—HCl 100 mM de pH 7,6, în raportul 1/5 greutate/volum.

Glucozo-6-fosfataza s-a extras în tampon citrat 100 mM de pH 6,5 [9], în raportul de 1/20 greutate/volum.

Glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza s-a extras în tampon TRIS-EDTA 100 mM de pH 7,4 [11], raportul de extracție fiind de 1/40 greutate/volum.

Toate operațiile de extracție și prelucrare au fost efectuate la rece. Omogenatele au fost menținute timp de 30 min la +4°C, apoi supuse la două centrifugări succesive: una la 6000 × g (+4°C), timp de 15 min, și alta la 17000 × g (+4°C), timp de 40 min. Supernatantele astfel obținute au fost folosite pentru determinările enzimatice, pentru dozarea proteinelor (metoda Lowry-Miller) și pentru efectuarea analizelor electroforetice (izoenzime).

Determinări enzimatice. Hexokinaza a fost determinată după metoda Crane și Sols [2], precum și prin metoda spectrofotometrică [3]. Pentru determinarea celor două tipuri de hexokinaze, în cazul ambelor metode s-a lucrat cu două concentrații diferite de substrat: 100 mM glucoză pentru activitatea totală a hexokinazelor și 0,5 mM glucoză pentru activitatea hexokinazelor cu K_m mic față de substrat. Prin diferență, s-a calculat activitatea glucokinazei, formă moleculară a hexokinazei cu K_m mare pentru glucoză [2]. Activitatea enzimatică s-a exprimat în μM P/min/g țesut umed la +37°C (prima metodă menționată) și în μM substrat consumat/min/g țesut umed (metoda spectrofotometrică).

Lactat-dehidrogenaza s-a determinat spectrofotometric la 340 nm [1]; activitatea s-a exprimat în unități/g țesut umed, o unitate fiind definită ca acea cantitate de enzimă dintr-un ml de extract care produce o modificare a absorbției de 0,001/min la +25°C.

Glucozo-6-fosfataza s-a determinat după metoda Harper [9], activitatea enzimatică fiind exprimată în μM P eliberat/min/g țesut umed la +37°C.

Glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza s-a determinat după metoda Löhr și Waler [11], prin măsurarea la 340 nm a creșterii absorbției datorită NADPH-ului format. Activitatea s-a exprimat în unități/min/g țesut umed, o unitate enzimatică fiind definită ca acea cantitate de enzimă dintr-un ml extract care la +25°C determină o modificare a absorbției cu 0,001/min.

Analiza electroforetică pentru separarea și evidențierea izoenzimelor s-a realizat în gel de amidon, în tampon discontinuu, după varianta Poulik [13]. Migrarea s-a efectuat la o tensiune de 10 V/cm și o intensitate de 2,8 mA/cm, timp de 150 min, la +8°C. Cantitatea de proteină supusă electroforezei a fost de 400 μg. După migrare, gelul a fost secționat și imersat în amestecul de reacție specific pentru evidențierea diferitelor izoenzime cercetate.

Astfel, identificarea hexokinazelor [10] s-a efectuat la pH 7,4 în tampon TRIS (100 mM), conținînd NADP (5 mM), ATP (5 mM), glucoză (0,5 mM, respectiv 100 mM), glucozo-6-fosfat-dehidrogenază (0,4 UI/ml),

Mg^{2+} (5 mM), KCN (2 mM), phenazin-methosulfat şi nitroblue-tetrazolium ; izoenzimele lactat-dehidrogenazei [10] s-au evidenţiat la pH 7,4 în tampon fosfat, conţinînd lactat de sodiu ca substrat, phenazin-methosulfat şi nitroblue-tetrazolium ; izoenzimele glucozo-6-fosfat-dehidrogenazei [10] s-au evidenţiat la pH 7,6 în tampon TRIS (300 mM), conţinînd glucozo-6-fosfat (25 mM), NADP (30 mM), Mg^{2+} (5 mM), phenazin-methosulfat şi nitroblue-tetrazolium.

Evaluarea cantitativă a activităţii izoenzimelor separate electroforetic s-a efectuat prin densitometrie şi planimetrie.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Activitatea succinat-dehidrogenazei poate constitui un factor major al reglării vitezei cu care este oxidat piruvatul. Malonatul, ca inhibitor competitiv al succinat-dehidrogenazei la nivelul ciclului acizilor tricarboxilici, este utilizat pentru stabilirea anumitor corelaţii metabolice şi adaptări ale energeticii celulare.

Referitor la corelaţia care se stabileşte între căile de metabolizare a glucidelor în ficat, în condiţiile de deviere a fluxului normal al ciclului acizilor tricarboxilici, datele experimentale obţinute arată că efectul exercitat de către malonat se repercutează în mod diferit asupra acestor căi ; într-adevăr, inhibiţia metabolică cu malonat determină modificări în activitatea enzimelor cercetate, precum şi asupra modelelor izoenzimatice respective. Gradul de modificare impus de acţiunea inhibitorului variază însă în funcţie de apartenenţa acestor enzime la una sau la alta din căile metabolismului glucidic, respectiv de solicitarea acestor enzime pentru orientarea desfăşurării, într-un sens sau altul, a reacţiilor metabolice conform cu condiţiile impuse celulei la un moment dat.

Astfel, sub acţiunea malonatului se înregistrează o creştere de 40% a activităţii hexokinazelor hepatice. După cum rezultă din tabela 1, această creştere se referă atît la hexokinazele cu K_m mic faţă de glucoză,

Tabela 1

Activitatea hexokinazelor hepatice în condiţii metabolice normale şi în inhibiţia cu malonat de sodiu. (Activitatea este exprimată în µM P/min/g ţesut la +37° C şi reprezintă media a opt determinări)

Loturi de experienţă	Hexokinaza totală	Glucokinaza	Hexokinaze cu K_m mic faţă de glucoză	Raportul glucokinază/ hexokinaze cu K_m mic faţă de glucoză
Lot martor	3,68±0,19	3,35±0,18	0,33±0,03	11,15±0,98
Inhibiţie cu malonat	5,17±0,26	4,34±0,62	0,82±0,09	5,30±0,76

cît şi la glucokinază, formă moleculară a hexokinazei specifică ficatului şi care se caracterizează printr-un K_m ridicat faţă de substrat.

Din datele prezentate în tabela 1 reiese că în celula hepatică, în care metabolizarea pe calea ciclului acizilor tricarboxilici este afectată de acţiunea agentului inhibitor, ar avea loc, compensativ, un mecanism de

„adaptare" a metabolismului celular. Creșterea semnificativă a activității hexokinazei totale, enzimă cu rol de reglare a fluxului metabolic glicolitic, poate fi interpretată în sensul unei modalități de corectare a proceselor energetice necesare activității celulare. Amplificarea procesului glicolitic prin acțiunea reglatoare a hexokinazei ar putea astfel contribui la furnizarea de energie, în condițiile în care ciclul oxidativ al acizilor tricarboxilici nu mai poate participa cu toată eficiența la generarea energiei necesare celulei.

Inhibiția cu malonat determină modificări atît la nivelul activității hexokinazelor hepatice, cît și la nivelul izoenzimelor sale. Astfel, din figura 1 rezultă că aceste modificări afectează atît glucokinaza, cît și celelalte forme moleculare ale hexokinazei cu K_m mic față de glucoză; la aceste forme se constată o creștere a activității, în raport cu lotul de referință. Pe de altă parte, după cum este cunoscut [4], [7], în ficat, raportul între forma moleculară a hexokinazei cu K_m mare față de glucoză (glucokinaza) și grupul hexokinazelor cu K_m mic față de glucoză este cu predominență în favoarea glucokinazei, enzimă specifică țesutului hepatic. Valorile lotului normal prezentate în tabela 1 se integrează în datele care subliniază rolul important pe care glucokinaza îl joacă în reglarea fluxului metabolic glicolitic. Inhibiția cu malonat determină însă, în comparație cu lotul normal, o modificare a raportului glucokinază/hexokinază cu K_m mic față de glucoză. Într-adevăr, din tabela 1 reiese că acest raport scade aproximativ la jumătate din valoarea înregistrată la lotul martor. Aceste rezultate se corelează și cu repartiția activității izoenzimelor hexokinazei, care indică o creștere a activității grupului cu K_m mic față de glucoză (fig. 1).

Modificarea acestui raport sugerează că în țesutul hepatic, în care metabolizarea oxidativă este viciată, cu repercusiuni asupra furnizării de energie necesară celulei, capacitatea catalitică a hexokinazei tinde să compenseze deficientul energetic; creșterea activității enzimei glicolitice atît la nivelul glucokinazei, cît și al celorlalte forme moleculare ale sale, precum și modificarea raportului între activitățile acestora, pot fi considerate ca o reflectare a modului de „adaptare" la condițiile impuse celulei de acțiunea malonatului.

Efectul inhibitor al malonatului se repercutează și asupra activității lactat-dehidrogenazei (LDH) și, respectiv, asupra modelului său izoenzimatic. Astfel, din tabela 2 se constată o scădere evidentă de aproximativ 74% a activității LDH totale, în condițiile inhibiției cu malonat. Examenul histologic nu indică modificări lezionale în celula hepatică sub acțiunea malonatului, care să justifice această diminuare accentuată a activității LDH printr-o eventuală eliberare a enzimei în spațiul extracelular. De altfel, determinările efectuate în ser nu indică modificări semnificative ale activității LDH și nici ale modelului izoenzimatic respectiv. Este deci de presupus că în cazul inhibiției competitive a succinat-dehidrogenazei, depresarea activității LDH ar putea fi consecința însumată a unor factori inhibitori care afectează cinetica enzimatică, factori între care se pot considera și concentrațiile de substrat sau produs de reacție [19].

Modelul izoenzimelor LDH în inhibiția cu malonat poate furniza, de asemenea, unele date cu privire la posibilitatea proceselor de „adaptare" metabolică. Astfel, din tabela 2 se constată o modificare semnificativă a

repartiţiei activităţii izoenzimelor LDH. Redistribuţia diferită a acestei activităţi în raport cu lotul martor se caracterizează printr-o creştere a activităţii tipului parental LDH_1, precum şi a formelor hibride LDH_2 şi LDH_3; concomitent, se înregistrează o scădere mai ales a formei parentale LDH_5 (67 %), în comparaţie cu lotul martor.

Diminuarea activităţii izoenzimei LDH_5 (tipul parental M specific ţesuturilor cu glicoliză intensă) reflectă nu numai anumite perturbări la

Tabela 2

Activitatea lactat-dehidrogenazei (LDH) hepatice şi repartiţia procentuală a izoenzimelor LDH în inhibiţia metabolică cu malonat (valorile reprezintă media a şase determinări)

Loturi experimentale	Activitatea LDH unităţi/mg proteină	Repartiţia procentuală a izoenzimelor LDH				
		LDH_1	LDH_2	LDH_3	LDH_4	LDH_5
Lot martor	3120±891	8,0	9,0	21,0	25,0	37,0
Inhibiţia cu malonat	813±110	21,7	19,2	24,2	22,2	12,7

nivelul catenei glicolitice — fapt dovedit şi prin diminuarea activităţii totale LDH —, dar şi posibile adaptări fiziologice legate de procesele de reglare metabolică. Astfel, scăderea marcantă, sub acţiunea malonatului, a activităţii izoenzimei LDH_5, care nu mai poate opera eficient în prezenţa unor praguri ridicate de lactat, ca şi creşterea activităţii izoenzimei LDH_1 (tipul parental H specific ţesuturilor cu profil oxidativ), sugerează posibilitatea existenţei unor tendinţe de ajustare, de readaptare la noile condiţii impuse ansamblului celular. Este posibil, de asemenea, ca modelul izoenzimatic LDH, respectiv repartizarea activităţii care se stabileşte între formele moleculare multiple ale LDH hepatice în urma acţiunii malonatului, să fie o consecinţă a modificării fluxului metabolic, în sensul orientării lui spre procesul neoglucogenetic, aşa cum par să sugereze datele experimentale care vor fi prezentate în continuare.

Un argument care atestă modificarea modelului izoenzimatic LDH din ţesutul hepatic, ca răspuns la necesităţile metabolice determinate de prezenţa inhibitorului, îl constituie şi valoarea raportului celor două tipuri parentale H şi M. Din figura 2 reiese că această valoare, în care intervin nu numai formele pure (tetramerii H şi M), ci şi hibrizii respectivi, se modifică sub acţiunea malonatului. Într-adevăr, după administrare de inhibitor, raportul H/M creşte, în comparaţie cu raportul H/M al lotului de referinţă. Se constată astfel că, în cazul inhibiţiei metabolice cu malonat, valoarea raportului H/M este complet inversată faţă de aceea a lotului martor.

Din datele prezentate rezultă că, la nivelul glicolizei, inhibiţia cu malonat determină în ţesutul hepatic anumite modificări. În condiţiile inhibiţiei metabolice, celula hepatică trebuie să-şi compenseze producerea de energie — devenită deficitară prin blocarea fluxului normal al ciclului acizilor tricarboxilici —, furnizîndu-şi această energie prin mobilizarea,

respectiv intensificarea glicolizei. Un argument în favoarea acestui proces de „adaptare" îl poate constitui creșterea activității hexokinazelor. Pe de altă parte, modificarea activității LDH, ca și a modelului său izoenzimatic, ar sugera că o acumulare de lactat, produsă ca urmare a activității LDH cu predominență într-unul din sensurile reacției, ar putea determina o creștere a fluxului gluconeogenetic.

Pentru a elucida acest aspect am urmărit și comportarea glucozo-6-fosfatazei, ca indicator al procesului de neoglucogeneză, știut fiind că această enzimă ocupă un loc important în acest proces prin controlul pe care-l exercită asupra glucozo-6-fosfatului. Acesta reprezintă, după cum s-a menționat, un metabolit de la care diverg cele trei căi ale metabolismului glucidic : glicoliza, gluconeogeneza și șuntul pentozic.

Rezultatele obținute referitoare la activitatea glucozo-6-fosfatazei hepatice sînt prezentate în tabela 3.

Tabela 3

Activitatea glucozo-6-fosfatazei hepatice în condițiile inhibiției metabolice cu malonat. (Activitatea este exprimată în μ moli P/min/g țesut umed și reprezintă media a opt determinări)

Valori normale	Inhibiție cu malonat
12,91±1,9	21,80±2,3

Din această tabelă reiese că în condițiile inhibiției cu malonat activitatea glucozo-6-fosfatazei prezintă o creștere semnificativă. Aceste date pot fi interpretate în sensul unei intensificări a procesului gluconeogenetic. Creșterea în concentrație a produșilor finali ai glicolizei — drept consecință a unei metabolizări deficitare pe calea ciclului Krebs în condițiile inhibiției cu malonat — ar putea determina o intensificare a procesului gluconeogenetic, cu posibile implicații în restabilirea homeostaziei celulare.

Activitatea și modelul izoenzimatic al glucozo-6-fosfat-dehidrogenazei, enzimă care controlează parțial fluxul glucozo-6-fosfatului deschizînd calea șuntului pentozic [8], [12], prezintă, de asemenea, modificări, ca urmare a acțiunii exercitate de către malonat. Din tabela 4 se remarcă o depresare semnificativă (aproximativ 40 %) a activității glucozo-6-fosfat-

Tabela 4

Activitatea glucozo-6-fosfat-dehidrogenazei hepatice în condițiile inhibiției metabolice cu malonat. (Activitatea este exprimată în unități/min/g țesut umed și reprezintă media a opt determinări)

Valori normale	Inhibiție cu malonat
3128±428	1813±213

dehidrogenazei hepatice în inhibiția cu malonat, comparativ cu lotul de referință. Acest fapt ar putea fi corelat cu utilizarea substratului, respectiv a glucozo-6-fosfatului, în calea gluconeogenetică de către glucozo-6-fosfa-

tază. Într-adevăr, după cum s-a menţionat anterior, activitatea acestei enzime gluconeogenetice este semnificativ crescută în inhibiţia cu malonat.

Anumite modificări se constată şi la nivelul modelului izoenzimelor glucozo-6-fosfat-dehidrogenazei. Din figura 3 se remarcă o simplificare a acestui model, prin tendinţa de dispariţie a formelor moleculare cu mobilitate electroforetică intermediară. Acest fapt se corelează cu diminuarea activităţii glucozo-6-fosfat-dehidrogenazei, sugerînd că inhibiţia cu malonat afectează metabolizarea glucozo-6-fosfatului pe calea şuntului pentozic.

Din datele prezentate rezultă că între căile glicolitică, gluconeogenetică şi pentozofosfat se stabilesc anumite corelaţii determinate de efectul exercitat de către malonat, inhibitor metabolic la nivelul ciclului acizilor tricarboxilici.

CONCLUZII

— În condiţiile afectării fluxului normal al ciclului acizilor tricarboxilici prin inhibiţie competitivă cu malonat, căile metabolismului glucidic prezintă, în celula hepatică, modificări care, cel puţin parţial, pot reflecta anumite posibilităţi de „adaptare".

— Hexokinazele hepatice (atît glucokinaza, cît şi formele moleculare caracterizate printr-un K_m mic faţă de substrat) prezintă o creştere a activităţii lor, ceea ce presupune o mobilizare a căii glicolitice pentru compensarea energiei celulare devenită deficitară în inhibiţia metabolică cu malonat.

— Raportul activităţilor glucokinază/hexokinaze cu K_m mic pentru substrat scade semnificativ în inhibiţia cu malonat, fapt ce poate reflecta un proces de adaptare la noile condiţii impuse celulei.

— În inhibiţia cu malonat, activitatea totală a lactat-dehidrogenazei se modifică semnificativ, precum şi repartiţia activităţii enzimatice între cele cinci forme moleculare; raportul subunităţilor parentale H/M se modifică, de asemenea, în sensul creşterii sale, în comparaţie cu lotul de referinţă.

— Activitatea glucozo-6-fosfatazei este semnificativ crescută, ceea ce presupune o activare a procesului gluconeogenetic.

— Glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza manifestă, drept urmare a utilizării substratului său de către glucozo-6-fosfatază, o depresare a activităţii sale; modificări semnificative se notează şi la nivelul izoenzimelor glucozo-6-fosfat-dehidrogenazei.

Prezentat la redacţie
la 18 iulie 1973

Departamentul de biochimie,
Institutul de ştiinţe biologice
şi
Institutul de medicină internă „Dr. N. Gh. Lupu"
Bucureşti

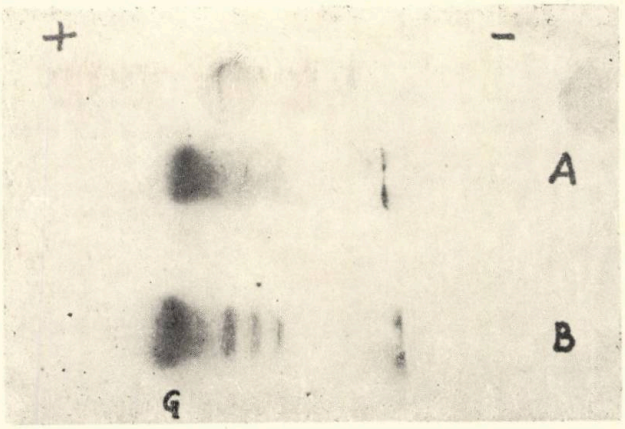


Fig. 1. — Modelul izoenzimatic al hexokinazei hepatice (A, normal; B, inhibiţie cu malonat; G, glucokinaza).

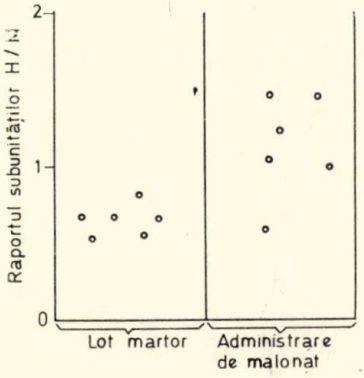


Fig. 2. — Raportul subunităţilor H/M în ficatul de iepure normal şi după administrare de malonat.

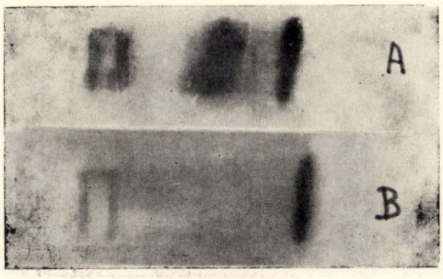


Fig. 3. — Izoenzimele glucozo-6-fosfat-dehidrogenazei hepatice (A, normal; B, inhibiţie cu malonat).

BIBLIOGRAFIE

1. BERGMEYER H. U., BERNT E., HESS B., în *Methoden der enzymatischen Analyse*, ed. BERGMEYER H. U., Verlag Chemie, Weinheim, 1962, p. 736.
2. CRANE R. K., SOLS A., în *Methods in enzymology*, ed. COLOWICK S. P., KAPLAN N. O., Academic Press, New York, 1955, vol. I, p. 277.
3. DUBIMINA E. C., Vopr. Med. Him., **12**, 81 (1966).
4. FREEDLAND R. A., Fed. Proc., **27**, 1217 (1968).
5. GONZALEZ C., URETA C., SANCHEZ R., MIEMEYER H., Biochim. Biophys. Res. Commun., **16**, 347 (1964).
6. GREKOVA N. I., Vopr. Med. Nim., **14**, 203 (1968).
7. GROSSBARD L., WEXLER M., SCHIMKE T., Biochem. Biophys. Res. Comm., **24**, 32 (1966).
8. GUMMA K. A., McLEAN P., Biochem. J., **115**, 1009 (1969).
9 HARPER E., în *Methods of enzymatic analysis*, ed. BERGMEYER H. U., Academic Press, New York, London, 1965.
10. LATNER A. L., SKILLEN A. W., *Isoenzymes in Medicine and Biology*, Academic Press, New York, London, 1968.
11. LÖHR W., WALER D., în *Methoden der enzymatischen Analyse*, ed. BERGMEYER H. U., Verlag Chemie, Weinheim, 1962, p. 744.
12. NOVELLO V., GUMAA K. A., McLEAN P., Biochem. J., **111**, 713 (1969).
13. POULIK M. D., Nature, **180**, 1477 (1957).
14. SCRUTTON M. C., UTTER M. F., Annu. Rev. Biochem., **37**, 249 (1968).
15. ȘERBAN MARGARETA, Rev. roum. Med. Int., **8**, 61 (1971).
16. ȘERBAN MARGARETA, ȘERBAN M., St. cerc. biochim.,**14**, 203 (1971).
17. ȘERBAN MARGARETA, ȘERBAN M., Rev. roum. Biochim., **10**, 273 (1973).
18. TOMKINS C. J., HEATH D. H., Biochem. J., **110**, 303 (1968).
19. VESELL S. E., BEARN A., J. clin. Invest., **40**, 586 (1961).
20. WEBER G., SINGHAL R. L., STAMM N. B., SRIVASTAVA S. K., Fed. Proc., **24**, 754 (1965).
21. WEBER G., Adv. Enzym. Regulat., **5**, 257 (1967).
22. WEBER G., Acta morph. Hung., **16**, 129 (1968).

RELATIONSHIPS BETWEEN DIFFERENT CARBOHYDRATE METABOLIC PATHWAYS DURING MALONATE INHIBITION

SUMMARY

When the normal flow of tricarboxilic acid cycle is damaged by competitive inhibition with malonate, the carbohydrate metabolic pathways in liver cells exibit some modifications which likely may represent a metabolic adaptation. Some peculiarities in the activity and isoenzyme patterns of some enzymes are presented, viz. : hexokinase (glucokinase and molecular forms with small K_m with respect to the substrate), lactate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and glucose-6-phosphatase.

The activity ratio of glucokinase to hexokinase with small k_m with respect to the substrate significantly decreases during malonate inhibition ; this fact also induces a depression in both lactate and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities, with a concomitant modification of isoenzyme patterns. The activity of glucose-6-phosphate is significantly increased, thus suggesting an activation of the gluconeogenetic processes.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 4, 429—436 (1973)

CONTRIBUȚII LA CARACTERIZAREA BIOCHIMICĂ A MUȘCHIULUI DE PORC CU MIOPATIE EXSUDATIVĂ

MIHAIL ȘERBAN, DITA COTARIU, GHEORGHE DĂNICEL, CORINA IORDACHE, NATALIA MOLDOVEANU, CORNEL MEDEȘAN și TRAIAN BENȚIA

Rezumat. — S-au urmărit modificările biochimice din diferite tipuri de mușchi de porc cu miopatie exsudativă (proteinele sarcoplasmatice, aminoacizii liberi, activitatea și modelele izoenzimatice ale lactat-dehidrogenazei și malat-dehidrogenazei, acidul lactic și fosforilcreatina). S-a stabilit o diferențiere a extractibilității proteinelor sarcoplasmatice, o creștere netă a activității LDH, paralelă cu mărirea valorilor de acid lactic, precum și unele modificări ale conținutului în aminoacizi liberi și fosforilcreatină. Determinarea activității LDH poate constitui un test eficace pentru diagnosticarea miopatiei exsudative.

Mușchiul de porc suferă post mortem un ansamblu de modificări biochimice care au un efect direct asupra calității cărnii și a produselor sale. În anumite condiții, încă insuficient precizate, carnea de porc dobîndește o stare anormală, devenind pală, moale și exsudativă.

Dată fiind importanța practică a problemei, s-au depus mari eforturi pentru elucidarea condițiilor care generează această stare și pentru caracterizarea parametrilor biochimici responsabili. Totuși, pînă la ora actuală, rezultatele obținute, deși promițătoare, nu sînt totdeauna concludente.

Dacă o serie de factori (viteza crescută a glicolizei, acumularea de acid lactic și scăderea implicită a pH-ului, concomitentă cu epuizarea substanțelor macroergice în condiții de temperatură ridicată etc.) [1] — [3] sînt în prezent unanim admiși ca agenți generatori posibili ai miopatiei exsudative, totuși verigile intermediare ale proceselor care duc la aceasta sînt încă insuficient sau deloc precizate. Pe de altă parte, trebuie subliniat și faptul deosebit de important, că evenimentele biochimice din mușchi depind și de tipul, respectiv de particularitățile funcționale ale acestuia [4], [5].

Pornind de la aceste considerente, ne-am propus efectuarea unui studiu biochimic pe tipuri diferite de mușchi diagnosticați cu miopatie exsudativă, respectiv normali, provenind de la porci crescuți în diverse regiuni ale țării (deci în condiții mai mult sau mai puțin diferite — climaterice, de hrană etc.). La acești mușchi au fost urmărite unele componente biochimice, astfel alese încît să dea indicații asupra desfășurării unor procese cu rol major în metabolismul mușchiului. Astfel, au fost cercetate proteinele sarcoplasmatice (cantitativ și calitativ, prin electroforeză), aminoacizii liberi (cantitativ și calitativ, prin cromatografie pe hîrtie),

activitatea lactat-dehidrogenazei (LDH) şi conţinutul în acid lactic, ca indicatori ai desfăşurării proceselor glicolitice, activitatea malat-dehidrogenazei (LDH), enzimă din catena de degradare oxidativă, fosforilcreatina, ca indicator al nivelului compuşilor macroergici musculari, precum şi modelele izoenzimatice LDH şi MDH.

MATERIAL ŞI METODE

Experienţele s-au efectuat pe diferite tipuri de muşchi (longissimus dorsi, biceps femor dorsi, semimembranosus, gluteus medius, semitendinosus, muşchii spatei) cu miopatie exsudativă, respectiv normali.

Extractele musculare au fost preparate în mod diferit, în funcţie de parametrii biochimici urmăriţi.

Extractele pentru dozarea proteinelor, respectiv pentru determinarea activităţii enzimatice şi a izoenzimelor, s-au făcut în tampon TRIS-HCl, pH 7,6, raportul de extracţie fiind de 1/3 greutate/volum. După 90 min extracţie, omogenatele obţinute la rece au fost centrifugate timp de 20 min, la 3000 × g (+4°C), iar supernatantele au fost recentrifugate la 16000 × g (+4°C).

Extractele pentru determinarea aminoacizilor liberi au fost făcute în acid tricloracetic 10 %, raportul de extracţie fiind 1/10 greutate/volum. După centrifugare timp de 30 min, la 5000 × g, supernatantul a fost trecut pe o coloană de Zerolit 225, iar eluţia aminoacizilor reţinuţi de răşină s-a efectuat cu o soluţie de amoniac 5 %.

Extractele pentru determinarea fosforilcreatinei s-au făcut în molibdat de amoniu 0,7 % în acid sulfuric 1 N, raportul de extracţie fiind 1/10 greutate/volum.

Extractele pentru determinarea acidului lactic s-au făcut în acid tricloracetic 10 %, raportul de extracţie fiind 1/10 greutate/volum.

Determinarea proteinelor s-a efectuat prin micrometoda Lowry [6], modificată de Miller [7]. Rezultatele au fost exprimate în mg proteină la 100 g ţesut umed.

Electroforeza proteinelor s-a efectuat în gel de amidon, tampon discontinuu de pH 8,5 [8], la o tensiune de 16 V/cm, o intensitate de 2 mA/cm, timp de 180 min, la +8°C. S-au aplicat 500 μg proteină. Detectarea fracţiunilor proteice s-a făcut cu soluţie de amidoblack B.

Izoenzimele LDH şi MDH au fost separate prin electroforeză în gel de amidon, în condiţiile menţionate, iar detectarea lor s-a făcut prin incubare la 37°C, în prezenţa substratelor respective (lactat, malat); mediul de reacţie mai conţinea NAD, fenazin-metosulfat şi nitrobluetetrazolium [9], [10].

Determinarea activităţii LDH s-a făcut spectrofotometric, la pH 7,5, urmărind oxidarea $NADH_2$ în prezenţa piruvatului, la 340 nm. Activitatea specifică a fost exprimată în unităţi enzimatice [11] raportate la 1 mg proteină.

Determinarea activităţii MDH s-a făcut spectrofotometric [12], la pH 7,4, urmărind oxidarea $NADH_2$ în prezenţa oxalacetatului, ca substrat, la 340 nm. Unităţile spectrofotometrice au fost raportate la 1 mg proteină, obţinînd astfel activitatea specifică.

Acidul lactic a fost dozat, în principiu, după metoda Barker şi Summerson [13]. Rezultatele au fost exprimate în mg acid lactic la 100 g muşchi.

Fosforilcreatina s-a determinat colorimetric, după metoda Alexeeva [14]. Citirile s-au făcut la 470 nm, iar rezultatele au fost exprimate în mg creatinină la 100 g muşchi.

Aminoacizii liberi s-au dozat colorimetric, după tehnica descrisă de Stein şi Moore [15]; citirile s-au făcut la 570 nm. Rezultatele au fost exprimate în μM echivalenţi leucină per g ţesut umed. Determinarea calitativă s-a făcut cromatografic, pe hîrtie Whatman nr. 1, în sistemul de irigare descendentă butanol-acid acetic-apă (110 : 30 : 110). Evidenţierea spoturilor s-a făcut cu o soluţie alcoolică de ninhidrină 2 %.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Proteine. În tabela 1 sînt prezentate valorile proteinelor sarcoplasmatice din diferite tipuri de muşchi de porc. După cum reiese din tabelă, cantitatea de proteine sarcoplasmatice extractibile diferă de la un tip de muşchi la altul. Astfel, valorile cele mai mari se observă la semimembranosus, gluteus şi longissimus dorsi, urmate de biceps femor dorsi şi spată, cele mai mici valori înregistrîndu-se la semitendinosus. Se constată, de asemenea, că extractibilitatea proteinelor sarcoplasmatice este scăzută la unele tipuri de muşchi miopatici (gluteus, longissimus, semimembranosus), în comparaţie cu martorii normali, diferenţele fiind uneori apreciabile. Scăderea extractibilităţii proteinelor sarcoplasmatice în cazul miopatiei exsudative a mai fost semnalată anterior [16] — [18], dar pînă în prezent nu s-a arătat că ea se produce doar la anumite tipuri de muşchi, aşa cum rezultă din experienţele noastre.

Tabela 1

Valorile proteinelor sarcoplasmatice din muşchi de porc normali şi cu miopatie exsudativă, exprimate în mg % g ţesut umed (valori medii din 6 determinări)

Tip de muşchi	Normal	Miopatie exsudativă	Diferenţa %
Longissimus dorsi	8,40±0,70	4,70±0,40	−78,7
Biceps femor dorsi	6,30±0,60	6,10±0,50	− 3,3
Semimembranosus	8,15±0,90	6,30±0,50	−29,3
Gluteus medius	7,90±0,70	4,50±0,45	−75,5
Semitendinosus	5,50±0,40	5,30±0,50	− 3,8
Muşchii spatei	6,10±0,50	5,80±0,55	− 5,1

Este posibil ca scăderea pH-ului — modificare notată la muşchii cu miopatie exsudativă — să inducă o anumită precipitare a proteinelor sarcoplasmatice, determinînd astfel scăderea extractibilităţii acestora în soluţii tamponate de forţă ionică scăzută [19]. Indiferent însă de cauzele care ar putea induce acest fenomen, faptul obiectiv rămîne, şi anume scăderea, uneori marcantă, a cantităţii de proteine solubile la unele tipuri de muşchi.

Analiza electroforetică în gel de amidon a proteinelor sarcoplasmatice provenite din muşchii cu miopatie exsudativă arată că nu se produc

alterări calitative semnificative la nivelul diferitelor tipuri de proteine. Acest fapt sugerează că nu anumite specii proteice sînt direct afectate în cursul desfăşurării proceselor care duc la apariţia miopatiei exsudative, ci mai curînd solubilitatea lor globală; această idee este în concordanţă cu datele existente în literatură. Aşa cum s-a arătat mai sus, în condiţiile apariţiei miopatiei exsudative s-ar produce o denaturare a proteinelor sarcoplasmatice, datorită pH-ului scăzut, fapt ce ar favoriza adsorbţia lor pe proteinele miofibrilare, cu scăderea implicită a solubilităţii [17].

Lactat-dehidrogenaza (LDH). În tabela 2 sînt prezentate valorile activităţii LDH din diferite tipuri de muşchi de porc normali şi, respectiv,

Tabela 2

Activitatea LDH din muşchi de porc normali şi cu miopatie exsudativă, exprimată în unităţi/mg proteină. 10^2 (valori medii din 6 determinări)

Tip de muşchi	Normal	Miopatie exsudativă	Diferenţa %
Longissimus dorsi	14000±700	23100±800	+65,0
Biceps femor dorsi	10830±558	14430±650	+33,0
Semimembranosus	11850±700	15850±700	+33,9
Gluteus medius	15400±700	20000±750	+29,8
Semitendinosus	10400±610	15700±600	+50,9
Muşchii spatei	8040±350	8300±320	+ 3,3

cu miopatie exsudativă. După cum reiese din tabelă, activitatea LDH prezintă anumite diferenţieri în funcţie de tipul de muşchi investigat. Dar semnificativ şi extrem de important este faptul că această activitate este net crescută la muşchii miopatici, creşterile fiind mai mult sau mai puţin accentuate, în funcţie de tipul de muşchi. Aceste creşteri se constată în următoarea ordine: longissimus, semitendinosus, semimembranosus, biceps, gluteus şi muşchii spatei. Creşterea activităţii LDH la muşchii miopatici trebuie, în mod indubitabil, pusă în legătură cu intensificarea proceselor glicolitice şi cu acumularea de lactat. Dacă pînă în prezent este unanim admis că printre fenomenele care generează miopatia exsudativă sînt intensificarea glicolizei şi acumularea de lactat, cu scăderea implicită a pH-ului (în condiţii de temperatură ridicată) [1], totuşi nu se cunoaşte la ce nivel biochimic au loc aceste procese. Experienţele noastre au dovedit că cel puţin una din etapele responsabile ale acestui proces este la nivelul LDH. De aceea, considerăm că determinarea activităţii LDH poate constitui un indice biochimic sensibil pentru diagnosticarea miopatiei exsudative.

În ceea ce priveşte izoenzimele LDH, se notează la muşchiul miopatic o oarecare preponderenţă a tipului parental M, tip specific ţesuturilor cu profil metabolic anaerob. De asemenea, s-au notat unele diferenţieri ale spectrului electroforetic LDH în funcţie de tipul de muşchi [4], [20].

Malat-dehidrogenaza (MDH). În tabela 3 sînt prezentate valorile activităţii MDH din muşchii de porc normali şi miopatici. Se constată că activitatea enzimatică din muşchii normali este destul de diferită, în funcţie de tipul de muşchi, variind între 271 — 578 U/mg proteină. Această variaţie este mai redusă la muşchiul miopatic, extremele situîndu-se între

382 — 560 U/mg proteină. Dacă în cazul LDH se constată o creştere a activităţii la muşchii miopatici, comparativ cu cei normali, în cazul MDH există o variaţie în funcţie de tipul de muşchi. Astfel, activitatea specifică poate scădea (biceps) sau creşte (gluteus, longissimus) în mod semnificativ, în timp ce în alte cazuri (semimembranosus, semitendinosus, muşchii spatei) variaţiile sînt nesemnificative.

Avînd în vedere că MDH este o enzimă care face parte din catena de degradare oxidativă, în interpretarea rezultatelor ar trebui ţinut seama

Tabela 3

Activitatea MDH din muşchi de porc normali şi cu miopatie exsudativă. Valorile medii (6 determinări) sînt exprimate în unităţi/mg proteină

Tip de muşchi	Normal	Miopatie exsudativă	Diferenţa %
Longissimus dorsi	271±15	450±30	+66,0
Biceps femor dorsi	578±31	423±23	−26,8
Semimembranosus	389±25	382±21	− 1,80
Gluteus medius	400±26	560±43	+40,0
Semitendinosus	555±32	515±30	− 7,2
Muşchii spatei	449±30	482±31	+ 7,3

şi de tipul tonic sau fazic al muşchilor respectivi. În condiţiile noastre experimentale, însă, în anumite cazuri (semimembranosus, semitendinosus) nu s-a lucrat pe muşchi izolaţi, ci pe mănunchiuri de muşchi care ar putea avea o populaţie miofibrilară mixtă.

Analiza spectrelor electroforetice ale MDH nu a evidenţiat nici o diferenţiere a izoenzimelor citoplasmatice şi mitocondriale, în funcţie de tipul de muşchi sau de starea acestuia.

Aminoacizii liberi. În tabela 4 sînt prezentate valorile medii ale aminoacizilor liberi din muşchii normali, respectiv miopatici. După cum

Tabela 4

Valorile aminoacizilor liberi din muşchi de porc normali şi cu miopatie exsudativă, exprimate în μM echivalent leucină/g ţesut umed (valori medii din 6 determinări)

Tip de muşchi	Normal	Miopatie exsudativă	Diferenţa %
Longissimus dorsi	32,5±2,5	28,5±2,5	−12,0
Biceps femor dorsi	25,1±1,3	29,0±2,0	+16,0
Semimembranosus	26,9±1,5	26,0±1,5	− 3,3
Gluteus medius	34,0±2,0	32,0±2,6	− 5,9
Semitendinosus	34,1±2,0	22,7±2,0	−33,5
Muşchii spatei	27,5±2,0	28,0±2,0	+ 3,7

reiese din tabelă, valorile normale sînt în funcţie de tipul de muşchi; astfel, la semitendinosus, gluteus şi longissimus aceste valori sînt ceva mai ridicate decît la semimembranosus, biceps şi spată. Problema conţinutului în aminoacizi în funcţie de tipul de muşchi este încă controversată [21], [22]. Rezultatele noastre ne fac însă să ne raliem la punctul de vedere al

acelor autori care susţin existenţa unor variaţii ale aminoacizilor liberi, în funcţie de tipul de muşchi [21].

De asemenea, în cazul miopatiei exsudative se constată o scădere a valorilor la semitendinosus şi longissimus şi o creştere a acestora la biceps; diferenţele în plus sau în minus întîlnite la semimembranosus, spată şi gluteus cu miopatie considerăm că intră în limita erorilor experimentale. Rezultatele obţinute ar sugera, deci, că anumite procese care se petrec în cursul apariţiei miopatiei exsudative ar diferi în funcţie de tipul de muşchi.

Acidul lactic. În tabela 5 sînt prezentate valorile medii ale acidului lactic din muşchii normali şi cu miopatie exsudativă. După cum reiese din

Tabela 5

Valorile acidului lactic din muşchi de porc normali şi cu miopatie exsudativă, exprimate în mg/100 g ţesut umed (valori medii din 6 determinări)

Tip de muşchi	Normal	Miopatie exsudativă	Diferenţa %
Longissimus dorsi	600±25	860±36	+43,3
Biceps femor dorsi	499±30	652±35	+30,6
Semimembranosus	543±28	775±39	+40,8
Gluteus medius	920±43	980±48	+ 6,5
Semitendinosus	368±31	525±28	+42,0
Muşchii spatei	637±32	683±35	+ 1,8

tabelă, valorile acidului lactic din muşchii normali variază, de asemenea, într-o anumită măsură, în funcţie de tipul de muşchi. Aceste valori se situează între 368—920 mg/100 g muşchi umed. La muşchii cu miopatie exsudativă se constată, în anumite cazuri, creşteri importante ale valorilor de acid lactic, între 30 — 43% faţă de valorile normale. Paralelismul dintre creşterea valorilor de acid lactic, termen final al catenei glicolitice (tabela 5), şi creşterea activităţii LDH, verigă finală a aceleiaşi catene (tabela 2), este ilustrat în figura 1, în care sînt reprezentate diferenţele procentuale ale valorilor de acid lactic, respectiv ale activităţii LDH între muşchii miopatici şi muşchii normali. Astfel, reiese că producerea crescută de acid lactic s-ar datora tocmai creşterii activităţii LDH.

Fosforilcreatina. În tabela 6 sînt prezentate valorile medii ale fosforilcreatinei din diferite tipuri de muşchi normali şi, respectiv, cu miopatie

Tabela 6

Valorile fosforilcreatinei din muşchi de porc normali şi cu miopatie exsudativă, exprimate în mg creatinină/100 g ţesut umed (valori medii din 6 determinări)

Tip de muşchi	Normal	Miopatie exsudativă	Diferenţa %
Longissimus dorsi	24,0±1,9	31,3±2,3	+30,4
Biceps femor dorsi	24,1±1,8	28,8±1,9	+19,4
Semimembranosus	25,7±1,8	22,0±1,7	—14,4
Gluteus medius	30,0±2,3	33,5±2,5	+11,6
Semitendinosus	26,7±2,2	32,2±2,9	+20,6
Muşchii spatei	21,7±1,4	22,3±2,0	+ 2,7

exsudativă. După cum reiese din analiza datelor din tabelă, se constată o oarecare variaţie a valorilor normale în funcţie de tipul de muşchi, valorile extreme situîndu-se între 21,7 şi 30,0 mg/100 g ţesut. La anumite tipuri de muşchi miopatici (semitendinosus, biceps, gluteus, longissimus) se notează creşteri mai mult sau mai puţin accentuate ale fosforilcrea-

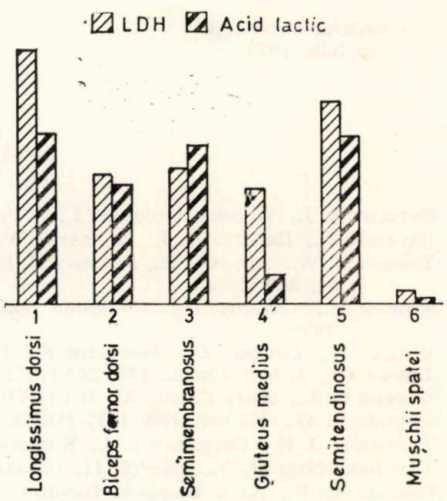


Fig. 1. — Diferenţele procentuale ale valorilor de acid lactic, respectiv ale activităţii LDH, între muşchii cu miopatie exsudativă şi muşchii normali.

tinei. La spată cu miopatie, valorile sînt apropiate de cele normale, iar la semimembranosus se remarcă chiar o oarecare scădere. Nu este exclus ca anumite condiţii în care au fost menţinute animalele ante mortem, cum ar fi clima, dieta şi eventual stress-ul, să fie la originea creşterii sau scăderii nivelului muscular al acestui compus macroergic, post mortem.

CONCLUZII

Analiza datelor obţinute a relevat existenţa unor modificări biochimice la muşchii cu miopatie exsudativă, comparativ cu muşchii normali.

Astfel, se remarcă diferenţierea extractibilităţii proteinelor solubile, creşterea netă a activităţii LDH, precum şi a valorilor de acid lactic. S-au mai notat, de asemenea, unele modificări ale conţinutului în aminoacizi liberi şi fosforilcreatină la muşchii miopatici.

Variaţiile menţionate sînt mai mult sau mai puţin accentuate, în funcţie de tipul de muşchi. În această ordine de idei, trebuie relevat faptul că la spata cu miopatie exsudativă apar cele mai mici variaţii ale indicilor biochimici studiaţi.

Considerăm ca semnificative pentru caracterizarea stării de miopatie exsudativă creşterea activităţii LDH, avînd ca produs de reacţie acidul lactic, creştere coroborată cu cea a valorilor acidului lactic muscular. Pentru acest motiv, credem că determinarea activităţii LDH ar putea

constitui un test eficace pentru diagnosticarea miopatiei exsudative. De asemenea, sugerăm necesitatea căutării acelor condiţii de menţinere şi manipulare a carcaselor care să nu favorizeze mărirea activităţii enzimei. Printre aceste condiţii, temperatura crescută ar putea avea un rol ce nu trebuie neglijat.

Prezentat la redacţie
la 20 iulie 1973

Departamentul de biochimie,
Institutul de ştiinţe biologice
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. Briskey E. J., Wismer-Pedersen J., J. Food. Sci., **26**, 297 (1961).
2. Sayre R. N., Briskey E. J., Hoekstra W., J. Food. Sci., **28**, 292 (1963).
3. Thomas M. W., Addis P. B., Johnson H. R., Noward R. D., Judge M. D., J. Food. Sci., **31**, 309 (1966).
4. Şerban M., Cotariu D., *Biochimia contracţiei musculare*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1970.
5. Şerban M., Cotariu D., Iordache C., Date nepublicate.
6. Lowry O., J. biol. Chem., **193**, 265 (1951).
7. Miller G. L., Anal. Chem., **31**, 964 (1959).
8. Poulik M. D., Nature, **180**, 1477 (1957).
9. Thorne C. J. R., Grossman L. I., Kaplan N. O., Biochim. biophys, Acta, **73**, 193 (1963).
10. Van der Helm H. Y., Lancet, **11**, 108 (1961).
11. Bergmeyer E., Arch. Biochem. Biophys., **109**, 57 (1965).
12. Ochoa S., în *Methods in enzymology*, Ed. S. P. Colowick şi N. O. Kaplan, Acad. Press, N. Y., vol. 1, p. 753, 1955.
13. Barker J. B., Summerson W. H., J. biol. Chem., **138**, 535 (1941).
14. Alexeeva A. M., Biohimia, **16**, 97 (1951).
15. Moore S., Stein W. H., J. biol. Chem., **211**, 907 (1954).
16. Borchert L., Powrie W., Briskey E. J., J. Food. Sci., **34**, 148 (1969).
17. McLonghlin J. V., Goldspink G., Irish. J. Agr. Res., **2**, 27 (1963).
18. McLonghlin J. V., J. Food. Sci., **33**, 383 (1968).
19. Sayre R. N., J. Food. Sci., **31**, 819 (1966).
20. Cotariu D., Şerban M., Rev. roum. Biochim., **9**, 23 (1972).
21. McCain G. R., Blumer T. N., Craig H. B., Steel R. G., J. Food. Sci., **33**, 142 (1968).
22. Field R. A., Yet-Dy Chang, J. Food. Sci., **34**, 329 (1969).

CONTRIBUTIONS TO THE BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF PIG MUSCLES WITH EXUDATIVE MYOPATHIA

SUMMARY

Biochemical modifications in different types of pig muscles with exudative myopathia were studied, viz. sarcoplasmic proteins, free amino acids, activities and izoenzyme patterns of lactate and malate dehydrogenases, lactic acid and phosphoryl creatine. It was found a discrimination in sarcoplasmic protein extractibility, a marked increase in LDH activity and lactic acid values, as well as some modifications of free amino acids and phosphoryl creatine contents. The determination of LDH activity may constitute an operative test for the diagnosis of exudative myopathia.

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 4, 437–444, (1973)

REFERAT GENERAL

RELAȚII INTRACELULARE ÎNTRE MICROETEROGENITATEA UNOR ENZIME ȘI SISTEMELE PROTEOLITICE

CECILIA MOTAȘ

Aspartat-aminotransferaza (2.6.1.1) și malat-dehidrogenaza (1.1.1.38) sînt enzime biloculare, cunoscute ca avînd structuri diferite în cele două compartimente (faza solubilă și mitocondrii) și comportări cinetice și funcționale deosebite [1], [2].

Fleisher și colab. [1] au separat din extractele apoase de diferite țesuturi două izoenzime ale aspartat-aminotransferazelor. Ulterior s-a demonstrat că izoenzima I, care migrează spre anod, este localizată în fracțiunea celulară, supernatantul de la 105 000 g, în timp ce izoenzima II, care migrează spre catod, este localizată în mitocondrii [2] — [8], [30] — [37]. Caracterizarea izoenzimelor transaminazice cunoscute, din mitocondrii și din supernatant, se poate face prin comportarea lor la două pH-uri deosebite, 5,5 și 7,6 [1], [9], [10]. Enzima mitocondrială nu este afectată de modificarea pH-ului optim 7,6, pe cînd enzima citoplasmatică are o activitate mult mai mică la pH 5,5 decît la pH 7,6. Caracterizarea efectuată cu seruri antitransaminazice, omologe și eterologe, a demonstrat specificitatea de formațiune a fiecărei izoenzime [9], [11] — [13].

Concomitent au început să apară lucrări care au arătat eterogenitatea izoenzimei din citoplasmă. Prin cromatografiere pe DEAE-celuloză s-au evidențiat în extractele saline de țesut două izoenzime anodice [14] — [16]. Prin electroforeză în amidon și colorare directă s-au obținut, din omogenatele de ficat și inimă de șobolan, 3—4 fracțiuni care migrează spre anod și au activitate transaminazică [17], [18]. Tot trei fracțiuni s-au obținut și prin cromatografiere pe CM-Sephadex [19] , [20]. Și din serul uman normal, concentrat, s-au obținut trei fracțiuni cu migrare spre anod și cu activitate transaminazică [21], [22].

Enzima citoplasmatică din creier prezintă de asemeni trei forme microeterogene, evidențiate prin comportare la pH-uri deosebite și prin seruri imune [10], [23].

În ceea ce privește enzima mitocondrială, s-au obținut forme multiple (2—6 forme) prin comportare la două pH-uri și prin reacție cu antiseruri omologe și eterologe [9], [19], [20]. Enzima din creier nu se obține decît prin mijloace mai drastice de extracție [24], [25] și nu prezintă decît o singură formă. Această comportare este pusă pe seama proprietăților deosebite ale mitocondriilor cerebrale [26], [27] sau pe prezența citoplasmei în preparatele mitocondriale [28], [29].

Aceeași microeterogenitate o prezintă și formele mitocondriale (5—6 forme) și citoplasmatice (3 forme) ale malat-dehidrogenazelor,

enzime cu aceeași repartiție intra- și extramitocondrială [38] — [48]. La creier, se obține, similar cu aspartat-aminotransferaza, în preparatele mitocondriale, formele citoplasmatice [49].

Foarte numeroase studii au evidențiat fenomenul multiplicității formelor moleculare ale multor enzime [50]. Pentru exemplificarea naturii acestor forme și a bazelor lor moleculare, Kaplan [51] a propus clasificarea bazată pe variante genetice și pe forme nedeterminate genetic. Deoarece microeterogenitatea uneia din formele moleculare este datorită unor cauze negenetice, ne vom ocupa doar de cauzele apariției formelor nedeterminate genetic. Conformerii, una din formele de microeterogenitate, sînt forme cu aceeași secvență și greutate moleculară, diferite în conformație, care se reflectă în diferențele de mobilitate electrică [51], [52]. Variantele conformaționale se pot împărți în două grupuri principale. Tipul conformațional indus de liganzi apare din interacțiunea uneia sau a mai multor molecule mici cu o enzimă. Al doilea tip include acele variante conformaționale care sînt rezultatul abilității lanțului peptidic de a-și asuma spontan mai mult decît o conformație stabilă. Moleculele mici, inductoare de modificări în conformație, sînt baza teoriilor actuale ale reglării metabolice prin interacțiuni alosterice. Diferențele de conformație implică o diferență în sarcina expusă, apărînd astfel variații în migrarea electroforetică și comportarea pe schimbători de ioni [42], [46]. Martinez-Carrion și colab. [19], [20] au obținut rezultate care sugerează posibilitatea ca diferitele subforme ale enzimei să existe ca atare în celula vie. Dacă ar fi artefacte, atunci ar trebui să fie formate foarte devreme în preparate și sub condiții extrem de blînde. Artefactele pot rezulta în urma scindării punților peptidice de către peptidaze. Proteoliza pare să fie responsabilă pentru cîteva forme multiple ale hexokinazei din drojdie [53]. Această scindare trebuie să fie totuși limitată, deoarece o rupere extensivă a legăturilor peptidice poate duce la o scădere a activității enzimatice sau chiar la o inactivare totală. Proteoliza a fost inclusă de Kaplan la capitolul artefacte [51].

Constanța apariției microeterogenității unor forme moleculare ale aspartat-aminotransferazelor și malat-dehidrogenazelor oricare ar fi procesul de separare a enzimelor ne-a condus la ideea că acțiunea enzimelor proteolitice nu este un artefact, ci unul din mecanismele celulare reale care produce microeterogenitatea enzimatică.

În favoarea supoziției că diferitele forme moleculare ar fi produși de degradare proteolitică vin următoarele :

a) Lucrările lui Martinez-Carrion asupra existenței reale în celulă a trei forme pentru enzima citoplasmatică [19], [20].

b) Rezultatele lui Colowick care sugerează că unele din formele multiple ale hexokinazei din *Saccharomyces cerevisiae* rezultă din activitatea proteolitică prezentă în preparatele lor cristaline [53], [54]. Este adevărat că încercările de a produce interconversia hexokinazelor de la mamifere prin activitatea proteolitică intrinsecă a omogenatelor prin incubarea tipurilor specifice de izoenzime ale hexokinazei cu diferite țesuturi nu au avut succes [55]. Pe de altă parte însă, activitatea proteolitică poate afecta puternic proprietățile de migrare ale izoenzimelor hexokinazei [55]. Tratarea tipului I de hexokinază cu tripsină produce o a doua formă, care migrează puțin mai rapid. Este interesant că separarea în gel

de agar a omogenatului brut de creier relevă cantităţi mici de activitate hexokinazică cu migrare similară. În plus, formele multiple de hexokinază de la drojdie produse de activitatea proteolitică au proprietăţi cinetice similare [53], în timp ce formele de la mamifere se pot distinge prin proprietăţi cinetice şi fizice [55].

c) Deoarece microorganismele au sinteza proteică foarte puternic accentuată, mecanismele de degradare au fost total neglijate. Recent s-a observat la o serie de microorganisme o proteoliză endogenă [56] — [59] odată cu separarea proteazelor proprii la unele din ele [56]. Prin proteoliza endogenă s-a explicat apariţia formelor moleculare multiple la o serie de enzime, cunoscute la microorganisme ca avînd o singură formă. De ex. : scindarea DNA-polimerazei în două enzime specifice, active, cu greutăţi moleculare definite [60] ori în mai multe forme moleculare multiple [61] şi tot în mai multe forme a metionil-t ARN-sintetaza [62]. Interesant este faptul că se obţin concomitent schimbări în proprietăţile catalitice ale izoenzimelor [56], sugerînd o funcţie specifică a proteazelor în transformarea enzimelor.

d) Rezistenţa la acţiunea enzimelor proteolitice a diferitelor enzime, indicată în ultima vreme de mulţi autori, [56], [63]—[65], este un argument că degradarea are loc treptat prin scindarea limitată a unor peptide destul de mici care le modifică sarcina, dar nu le modifică activitatea catalitică. Un proces asemănător are loc şi la nivelul altor proteine biologic active, ca imunoglobulinele [66] — [68]. Nu există o rupere excesivă a legăturilor peptidice în celulă din primele momente ale acţiunii proteazelor pentru a duce la inactivarea imediată a activităţii enzimatice. Dar chiar pierderea activităţii enzimatice nu dovedeşte cu nimic că proteina-enzimă este degradată pînă la aminoacizi. Asemenea proces poate reprezenta numai o schimbare mică în moleculă, fără implicarea hidrolizei pînă la aminoacizi.

e) Prezenţa proteazelor proprii în mitocondrii şi citoplasmă, pe lîngă cele din lizozomi, şi mai ales a proteazelor neutre [69], merge concomitent cu apariţia formelor moleculare multiple ale unor enzime.

f) Intervenţia procesului de degradare în celulă, paralel cu procesul de sinteză, interdependenţa lor pentru menţinerea echilibrului celular [56], [70]. Procesul de catabolism s-a constatat a fi unul din mecanismele de reglare a nivelului enzimatic [70].

g) Constatarea că izoenzimele de tipul malat-dehidrogenazelor şi aspartat-aminotransferazelor prezintă diferite grade de extracţie cu acelaşi solvent, ca apa sau butanolul, sau cu solvenţi diferiţi. Pentru enzima mitocondrială, Borst [14] găseşte o proporţie de 2% ca foarte uşor solubilă, pe cînd restul necesită intervenţia detergenţilor; Eichel [5] indică o proporţie uşor solubilă şi o alta extractibilă prin întrebuinţarea sistemului Waring-blender, forme care nu sînt influenţate de schimbarea pH-ului. Bhargava [71] identifică două forme pentru izoenzima mitocondrială, distincte după capacitatea de prindere pe membrană. De aceea, aceste forme au solubilităţi diferite în butanol şi prezintă caracteristici electroforetice şi cromatografice distincte. Pentru aceeaşi enzimă rezultate asemănătoare obţinuse anterior şi Boyd [16]. Solubilizarea în mediu apos prin îngheţare-dezgheţare a numai unei pătrimi din activitatea enzimei rămasă

în depozitul de membrane, la creier [10], şi aproximativ o jumătate la ficat [9].

Localizarea acestor forme în structura mitocondrială în compartimentul extern [72], [73] sau în matrix [74] — [76] poate fi conectată cu prezenţa proteazelor alcaline proprii ale mitocondriilor [69], care le pot modifica, în funcţie de aşezarea reciprocă în interiorul mitocondriei.

Interacţiunea izoenzimei citoplasmatice cu enzimele proteolitice proprii ale acesteia [77] se poate pune în legătură cu prezenţa în citoplasmă a proteinelor structurale, necatalitice care pot forma structura organizată a acesteia [78] — [81].

Toate aceste argumente au întărit ideea că microeterogenitatea nu ar reprezenta decît stadii ale procesului de proteoliză a unei forme de izoenzimă a aspartat-aminotransferazei şi că conformerii ar reprezenta deci produşii de degradare proteolitică a unei singure enzime. Intervenţia sistemelor proteolitice ar putea fi unul din mecanismele negenetice reale ale celulei pentru formarea microeterogenităţii enzimatice.

Pentru confirmarea acestei idei, este necesar să se arate prezenţa simultană, pe acelaşi preparat, a ambelor sisteme enzimatice, cel proteolitic cu acela care prezintă microeterogenitatea. Importantă este demonstrarea activităţii proteolitice, mai ales alcaline, în faza solubilă şi în mitocondrii.

Sistemele enzimatice care intervin în catabolizarea proteinelor tisulare s-au împărţit, în mod arbitrar, în endo- şi exopeptidaze [82]. Grupul enzimelor endopeptidazice este format din catepsine, cu pH optim în jur de 5,0, proteaze II neutre, cu pH optim în jur de 8,0, şi arilpeptidaze, cu pH optim în jur de 7,0 [83]. Din grupul catepsinelor fac parte catepsinele A, B, C, D şi E, enzime destul de bine studiate, separate în studii de purificare mai mult sau mai puţin înaintate : A [84], B [85], [86], C [87], [88], D [89], [90] şi E [91]. Protеazele II alcaline, cu pH optim în jur de 8,0, formează un sistem enzimatic încă atît de puţin cunoscut, încît existenţa lui este mai mult contestată [92] decît confirmată, iar încercări de separare s-au făcut pe muşchi [93], pe creier [94] şi pe cornee [95].

În ceea ce priveşte repartiţia endopeptidazelor tisulare, se ştie că, în majoritatea lor, catepsinele sînt localizate în mitocondrii, şi în special în lizozomi [96] — [100]. Lizozomii, prin conţinutul lor ridicat în enzime proteolitice, sînt locul de degradare a constituenţilor proteici naturali celulari. Nu se cunoaşte cît de avansată este această degradare, şi nici natura şi soarta produşilor finali de scindare ai fiecărui tip de proteină.

În faza solubilă se găsesc proteazele alcaline, a căror prezenţă se poate decela în toate formaţiunile [77], [93], [96] şi a căror activitate variază cu substratul [77]. Activitatea proteolitică a mitocondriilor este asemănătoare cu aceea a lizozomilor, în sensul că pH-ul optim de activitate al proteazelor acide variază cu substratul [77], [89], [101]. În acest fel se sugerează posibilitatea existenţei a mai mult decît o singură cale de proteoliză, fiecare predominînd în funcţie de proteina hidrolizată [102].

S-a demonstrat existenţa unor enzime proteolitice cu pH-ul optim alcalin la muşchi [93], creier [94], cornee [95] şi la mitocondriile de ficat cu o activitate specifică cu numai 30 % mai mică decît la pH 3,5 [77], [103]. Se presupune o eterogenitate a proteazelor neutre tisulare, cu participarea lor la turnover-ul fiziologic al proteinelor [104]. Catabolizarea albumi-

nei de către formaţiunile mitocondriale la pH 7,0 [105] se poate datora aceloraşi enzime, cu toate că rezultatele nu au mai fost confirmate [106]. Mai recent, s-a confirmat, prin autoliză, existenţa în formaţiunile din ficat, cu predilecţie în mitocondrii, a unei enzime proteolitice cu pH optim alcalin [69], [107], [108], [115]. Astfel Alberti şi colab. [102], [107], [116] demonstrează, *in vivo*, apariţia de aminoacizi în celulă sub influenţa proteazelor neutre. S-ar putea însă ca enzimele care acţionează în proteoliza endogenă să nu fie aceleaşi care atacă proteinele adăugate ca substrat [69], [102], [108].

Catepsina A, localizată atît în mitocondrii (101), (77), cît şi în lizozomi [77], [101], [109], [110], al cărei rol celular nu se cunoaşte, poate fi socotită ca o exopeptidază, deoarece se menţionează că lucrează pe substratele eliberate în urma acţiunii catepsinei D [111]. Catepsinele D, E şi B sînt enzime tipic lizozomale, a căror prezenţă în preparatele mitocondriale se datoreşte contaminării acestora cu lizozomi.

Existenţa reală în faza solubilă a unor proteaze alcaline a căror activitate variază cu substratul, variaţia pH-ului optim de activitate a proteazelor acide în funcţie de substrat la mitocondrii şi lizozomi [77] şi prezenţa proteazelor alcaline în mitocondrii sugerează posibilitatea să existe mai mult decît o singură cale de proteoliză, fiecare predominînd în funcţie de proteina hidrolizată.

Aceste date concordă cu descoperirea unor proteaze specifice pentru unele grupuri de enzime, ca tirozin-transaminaza [112] sau glucozo-6-fosfataza [113], sau pentru grupuri specifice de enzime, ca cele NAD sau FAD dependente [114]. Acestor proteaze specifice ar putea să li se datoreze fenomenul de microeterogenitate a unor enzime.

Degradarea treptată a proteinelor substrat este sugerată şi de prezenţa catepsinei A care se presupune a lucra pe substrate eliberate în urma acţiunii catepsinei D. Ar exista deci o secvenţializare a acţiunii proteazelor, care ar putea fi implicată în fenomenul microeterogenităţii. Scindarea unor peptide mici ar fi deajuns să modifice încărcarea electrică a enzimei, dar nu să le modifice activitatea catalitică şi nici greutatea moleculară într-atît încît să poată fi decelabilă.

Prezenţa proteazelor acide şi alcaline în formaţiunile intracelulare, ca mitocondrii şi faza solubilă, a întărit ideea că sistemele proteazice ar putea fi unul din mecanismele reale ale celulei pentru producerea microeterogenităţii enzimatice, formele moleculare multiple reprezentînd stadii ale procesului de proteoliză.

Prezenţa proteazelor alcaline proprii în faza solubilă şi în mitocondrii poate conduce la presupunerea că unul din mijloacele de control al nivelului enzimatic în formaţiunile din celulă este tocmai acest sistem proteolitic.

Prezentat la redacţie la 26 iulie 1973

Departamentul de biochimie,
Institutul de ştiinţe biologice,
Bucureşti

—c. 3320

BIBLIOGRAFIE

1. Fleisher A. G., S. C. Potter, G. K. Wakim, Proc. Soc. exp. Biol., **103**, 229 (1960).
2. Boyd W. J., Biochem. J., **81**, 434 (1961).
3. Boyd W. J., Biochem. J., **81**, 39P (1961).
4. Boyd W. J., Biochem. J., **84**, 14P (1962).
5. Eichel J. H., J. Bukovsky, Nature, **191**, 243 (1961).
6. Segal L. H., D. S. Beattie, S. Hopper, J. biol. Chem., **237**, 1914 (1962).
7. Sheid B., P. H. Morris, S. J. Roth, J. biol. Chem., **240**, 3016 (1965).
8. Otani T. T., P. H. Morris, în *Advances in enzyme regulation*, ed. Weber G., Pergamon Press, 1965, p. 325.
9. Şelariu Cecilia, St. cerc. biochim., **11**, 75 (1968).
10. Şelariu Cecilia, St. cerc. Biochim., **10**, 341 (1967).
11. Nisselbaum S. J., O. Bodansky, J. biol. Chem., **239**, 4232 (1964).
12. Yoshimasa Morino, H. Kagamiyama, H. Wada. J. biol. Chem., **239**, PC943 (1964).
13. Sanchez de Jiménez E., L. A. Brunner., G. Soberon, Arch. Biochem. Biophys., **120**, 175 (1967).
14. Borst P., E. M. Peeters , Biochim. Biophys. Acta, **54**, 188 (1961).
15. Marco R. J., Sebastian, A. Sols, Biochem. Biophys. Res. Comm., **34**, 725 (1969).
16. Boyd W. J., Biochim. biophys. Acta, **113**, 302 (1966).
17. Decker E. L., M. E. Rau, Proc. Soc. exp. Biol., **112**, 144 (1963).
18. Yamada K., S. Sawaki, A. Fukumura, H. Hayashi, J. Vitaminology, **8**, 286 (1962).
19. Martinez-Carrion M., F. Riva, C. Turano, P. Fasella, Biochem, Biophys. Res. Comm., **20**, 206 (1965).
20. Martinez-Carrion M., C. Turano, E. Chiancone., F. Bossa, A. Giartosio, F. Riva, P. Fasella, J. biol. Chem., **242**, 2397 (1967).
21. Block W. D., R. Carmichael, C. E. Jackson, Proc. Soc. exp. Biol., **115**, 941 (1964).
22. Augustinsson B. K., K. Erne, Experientia, **17**, 396 (1961).
23. Boyde C. R. T., A. L. Latner, Biochem. J., **82**, 51P (1962).
24. Sellinger Z. O., D. L. Rucker, Biochim. biophys. Acta, **67**, 504 (1963).
25. Halowach J., M. C. Howe, R. H. Laatsch, D.-B. Mc Dougal Jr., Biochim. bipohys. Acta, **118**, 230 (1966).
26. Gallagher H. C., J. D. Judah, K. R. Roes, Biochem. J., **62**, 436 (1956).
27. Tanaka R., L. G. Abood, Arch. Biochem. Biophys., **105**, 554 (1964).
28. Johnson M. R., Biochem. J., **77**, 610 (1960).
29. Johnson M. R., P. V. Whittaker, Biochem. J., **88**, 404 (1963).
30. Swick W. R., P. L. Bernstein, J. L. Stange, J. biol. Chem., **240**, 3334 (1965).
31. Sheid B., J. S. Roth, în *Advances in enzyme regulation*, ed. G. Weber, Pergamon Press, vol. III, 1965, p. 335.
32. Fahien A. L., S. E. Smith, Arch. Biochem. Biophys., **135**, 136 (1969).
33. Hoock H. R., C. S. Vestling, Biochim. biophys. Acta, **65**, 358 (1962).
34. Boyde C. R. T., Biochem. J., **106**, 581 (1968).
35. Nisselbaum S. J., Analyt. Biochem., **23**, 173 (1968).
36. Banks C. E. B., S. Doonan, A. J. Lawrence, C. A. Vernon, Eur. J. Biochem., **5**, 528 (1968).
37. Dixon F. B. H., E. S. Severin, Biochem. J., **110**, 19P (1968).
38. Kaplan O. N., în *Mechanism of action of steroid hormones*, ed. Villee A. C , A. A. Engel, Pergamon Press, 1961, p. 247.
39. Siegel L., S. England, Biochim. biophys. Acta, **64**, 101 (1962).
40. Thorne R. J. C., L. I. Grossman, N. O. Kaplan, Biochim. biophys. Acta, **73**, 193 (1963).
41. Thorne J. R. C , P. M. Cooper, Biochim. biophys Acta, **81**, 397 (1964).
42. Kitto B. G., M. P. Wassarman, J. Michejda, N. O. Kaplan, Biochem. Biophys. Res. Comm., **22**, 75 (1966).
43. Kitto G. B., M. E. Katike, L. H. Bertland, W. H. Murphey, N. O. Kaplan, Arch. Biochem. Biophys., **121**, 224 (1967).
44. Kitto G. B., G. R. Lewis, Biochim. biophys. Acta, **131**, 1 (1967).
45. Mann G. K., C. S. Vestling, Biochim. biophys. Acta, **159**, 567 (1968).
46. Kulick J. R., F. W. Barnes, Biochim. biophys. Acta, **167**, 1 (1968).
47. Kitto G. B., F. E. Stolzenbach, N. O. Kaplan, Biochem. Biophys. Res. Comm., **38**, 31 (1970).
48. Skilleter N. D., N. M. Lee, E. Kun, Eur. J. Biochem., **12**, 533 (1970).
49. Johnson M. R , Biochem. J., **84**, 25P (1962).

50. MARKERT L. C., Ann. N. Y. Acad. Sci., **151**, 14 (1968).
51. KAPLAN O. N., Ann. N. Y. Acad. Sci., **151**, 382 (1968).
52. EPSTEIN J. C., A. N. SCHECHTER, Ann. N. Y. Acad. Sci., **151**, 85 (1968).
53. KAJI A., K. A. TRAYSER, S. P. COLOWICK, Ann. N. Y. Acad. Sci., **94**, 798 (1961).
54. KAJI A., Arch. Biochem. Biophys., **112**, 54 (1965).
55. SCHIMKE T. R., L. GROSSBARD, Ann. N. Y. Acad. Sci., **151**, 332 (1968).
56. THANG N. M., L. DONDON, TH. GODEFROY-COLBURN, Biochimie, **53**, 291 (1971).
57. GADJA T. A., G. ZAROR, P. S. FITT, Biochem. J., **120**, 753 (1970).
58. KLEE B. C., J. Biol. Chem., **244**, 2558 (1969).
59. FITT S. P., H. WILLE, Biochem. J., **112**,497 (1969).
60. BRUTLAG D., M. R. ATKINSON, P. SETLOW, A. KORNBERG, Biochem. Biophys. Res.Comm., **37**, 982 (1969).
61. YOSHIDA S., L. F. CAVALIERI, Proc. Natl. Acad. Sci., **68**, 200 (1971).
62. CASSIO D., J. P. WALLER, Eur. J. Biochem., **5**, 33 (1968).
63. KLEE A. W., R. A. STREATY, J. Biol. Chem., **245**, 1227 (1970).
64. VESELL S. E., K. L. YIELDING, Ann. N. Y. Acad. Sci., **151**, 678 (1968).
65. BOND S. J., Biochem. Biophys. Res. Comm., **43**, 333 (1971).
66. MOTAŞ C., V. GHEŢIE, Immunochemistry, **6**, 547 (1969).
67. GHEŢIE V., C. MOTAŞ, Immunochemistry, **8**, 89 (1971).
68. MOTAŞ C., V. GHEŢIE, S. MIHĂESCU, St. cerc. Biochim., **14**, 171 (1971).
69. FITZPATRICK K., R. J. PENNINGTON, Biochem. J., **111**, 29P (1969).
70. SCHIMKE T. R., D. DOYLE, Ann. Rev. Biochem., **39**, 929 (1970).
71. BHARGAVA M. M., A. STREENIVASAN, Biochem. J., **108**, 619 (1968).
72. ALLMANN W. D., BACHMANN, N. ORMO-JOHNSON, W C. TAN, D. E. GREEN, Arch. Biochem Biophys., **125**, 981 (1968).
73. ROODYN B. D., în *Enzyme cytology*, ed. ROODYN B. D., Academic Press, 1967, p. 103.
74. SOTTOCASA L. G., Biochem. J., **105**, 1P (1967).
75. LANDRISCINA C., S. PAPA, P. COCATELLI, L. MAZZARELLA., E. QUAGLIARIELLO, Biochim. Biophys. Acta, **205**, 136 (1970).
76. SCHNAITMAN C., J. W. GREENAWALT, J. cell. Biology, **38**, 158 (1968).
77. MOTAŞ C., St. cerc. biochim., **13**, 169 (1970).
78. WOODWARD O. D., K. C. MUNKRES, în *Organizational Biosynthesis*, ed. VOGEL J. H., LAMPEN O. J., BRYSON V., Academic Press, 1967, p. 325.
79. ŞELARIU C., Rev. roum. Biochim., **2**, 357 (1965).
80. ŞELARIU C., Rev. roum. Biochim., **2**, 79 (1965).
81. MOTAŞ C., Teză de doctorat, 1973.
82. FRUTON J. S., în *Enzymes*, ed. P. D. BOYDER, H. LARDY, H. K. MYRBÄCK, vol. 4, Academic Press, 1960, p. 233.
83. MAHADEVAN S., A. L. TAPPEL, J. biol. Chem., **242**, 2369 (1967).
84. IODICE A. A., V. LEONG, I. M. WEINSTOCK, Arch. Biochem. Biophys., **117**, 477 (1966).
85. SNELLMAN O., Biochem. J., **114**, 673 (1969).
86. GREENBAUM M. L., J. S. FRUTON, J. Biol. Chem., **226**, 173 (1957).
87. HABA DE LA G., P. S. CAMMARATA, S. N. TIMASHEFF, J. biol. Chem., **234**, 316 (1959).
88. PLANTA J. R., M. GRUBER, Biochim. biophys. Acta, **89**, 503 (1964).
89. PRESS M. E., R. PORTER, J. CEBRA, Biochem. J., **74**, 501 (1960).
90. BARRETT A. J., Biochem. J., **104**, 601 (1967).
91. LAPRESLE C., T. WEBB, Biochem. J., **84**, 455 (1962).
92. UMANA R., Arch. Biochem. Biophys., **129**, 767 (1969).
93. KOSZALKA R. T., L. L. MILLER, J. biol. Chem., **235**, 669 (1960).
94. MARKS N., A. LAJTHA, Biochem. J., **97**, 74 (1965).
95. VAN HEYNINGEN, R., S. G. WALLEY, Biochem J., **86**, 92 (1963).
96. DUVE DE C., C. WATTIAUX, P. BAUDHUIN, Adv. Enzymology, **24**, 291 (1962).
97. GIANETTO R., C. DE DUVE, Biochem. J., **59**, 433 (1955).
98. FINKENSTAEDT T. J., Proc. Soc exp. Biol. Med., **95**, 302 (1957).
99. BOUMA W. M. J., M. GRUBER, Biochim. biophys. Acta, **89**, 545 (1964).
100. BOUMA W. M. J., M. GRUBER, Biochim. biophys. Acta, **113**, 350 (1966).
101. COFFEY W. J., C. DE DUVE, J. biol. Chem., **243**, 3255 (1968).
102. ALBERTI M. M. G. K., W. BARTLEY, Biochem. J., **87**, 104 (1963).
103. WALEY G. S., R. HEYNINGEN, Biochem. J, **83**, 274 (1952).
104. MARKS N., A. LAJTHA, Biochem. J., **89**, 438 (1963).
105. PENN W. N., Biochim. biophys. Acta, **53**, 490 (1961).
106. BEEKEN L. W., K. IMREDY, Biochim. biophys. Acta, **62**, 579 (1962).

107. ALBERTI M.M.G.K., W. BARTLEY, Biochem. J., **111**, 763 (1969).
108. BAIRD D. G., Biochim. biophys. Acta, **93**, 293 (1964).
109. SAWANT L. P., I. D. DESAI, L. A. TAPPEL, Biochim. biophys. Acta, **85**, 93 (1964).
110. SHIBKO S., L. A. TAPPEL, Biochem. J., **95**, 731 (1965).
111. IODICE A. A., Arch. Biochem. Biophys., **121**, 241 (1967).
112. KENNEY T. F., Science, **156**, 525 (1967).
113. BONSIGNORE A., A. DE LA FLORA, M. A. MANIGIAROTTI, I. LORENZONI, S. ALEMA, Biochem. J., **106**, 147 (1968).
114. KATUNUMA N., E. KOMINAMI, S. KOMINAMI, K. KITO, T. MATZUZAWA, in *Metabolic interconversion of enzymes*, ed. WIELAND, O., E. HEIMREICH, H. HALZER, Springer-Verlag, 1972, p. 159.
115. MARRINK J., M. GRUBER, FEBS Letters, **1**, 69 (1968).
116. ALBERTI M.M.G.K., W. BARTLEY, Biochem. J., **95**, 641 (1965).

ST. CERC. BIOCHIM., 16, 4, 445–450 (1973)

RECENZII

Anaesthesia in organ transplantation (Anestezia în transplantarea organelor), editori T. HILLARY HOWELLS, ALAN W. GROGONO, Edit. S. Karger, Basel—München—Paris—London—New York—Sydney, 1972, 169 p., 46 fig., 8 tab.

Această lucrare se înscrie în frumoasele preocupări ale editurii S. Karger, de a publica monografii dedicate problematicii actuale a domeniilor interdisciplinare, de mare interes atît pentru clinician, cît și pentru cercetătorul care studiază biologia transplantării.

Volumul cuprinde un bogat material, repartizat judicios între diversele tipuri de transplantație de importanță actuală.

Două capitole dedicate transplantării de rinichi, scrise de J. F. Moorhead, J. D. Robertson și G. W. Stephan, acoperă cu succes toate etapele de parcurs pentru realizarea unui transplant renal, începînd cu selecția pacienților și terminînd cu perioada postoperatorie, beneficiind de bogata experiență dobîndită în acest domeniu, pînă în prezent, în multe centre din lume.

Se remarcă de asemenea bogatele capitole privitoare la transplantarea de ficat, dintre care o mențiune importantă o merită capitolul „Selecția și prepararea pacienților pentru transplantul hepatic", scris cu o deosebită seriozitate și competență de Sheila Sherlock.

Faptul că morbiditatea în transplantație, imunogenetica rejecției de grefă și imunosupresia sînt tratate în secțiuni separate ale volumului, cu o deosebită grijă, duce la întregirea monografiei, care, depășind scopurile propuse prin titlu, devine un valoros îndreptar pentru abordarea problemelor de transplantație la nivelul cunoștințelor și tehnicității actuale.

Andrei Augustin
Institutul de patologie și
genetică medicală „V. Babeș"
București

GEORGE KALDOR, *Physiological Chemistry of Proteins and Nucleic Acids in Mammals* (Chimia fiziologică a proteinelor și acizilor nucleici la mamifere), W. B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, 1969, 221 p.

Cartea prof. G. Kaldor își propune un scop clar și binevenit, acela de a pune la îndemîna cercetătorilor din domeniul biochimiei organismelor superioare noțiunile fundamentale, cîștigate în domeniul cunoscut astăzi sub denumirea de biologie moleculară. Se poate afirma că acest scop este atins în cea mai mare parte.

Autorul introduce treptat, pe parcursul a 10 capitole, o serie de noţiuni fundamentale întîlnite în studiile despre acizi nucleici şi proteine. Capitolul 1 descrie componenţii proteinelor şi introduce noţiunea de amfoliţi şi de aminoacizi esenţiali. Cel de-al doilea capitol tratează proprietăţile aminoacizilor din punct de vedere fizico-chimic şi caracterul de macromolecule al proteinelor. Capitolele 3 (structura proteinelor) şi 4 (metode de analiză a proteinelor şi aminoacizilor) fundamentează noţiunile de structură primară, secundară şi terţiară. Capitolul 5 este o prezentare rezumativă a criteriilor de clasificare a proteinelor. Ca exemplu de activitate a proteinelor se tratează, în capitolul 6, activitatea lor enzimatică şi modul de caracterizare a acesteia.

După o descriere schematică a compoziţiei, a structurii primare şi spaţiale a acizilor nucleici şi a nucleoproteinelor, autorul indică tehnici fizico-chimice uzuale de investigare a acestor parametri. Capitolul 7 cuprinde şi expunerea sugestivă a cîtorva experienţe model care au dus la precizarea rolului biologic al acizilor nucleici.

Capitolul 8 lărgeşte cadrul semnificaţiei funcţionale a proteinelor, indicînd rolul lor de anticorpi, hormoni şi transportori, precum şi implicaţiile lor în procese fiziologice complexe cum sînt coagularea sîngelui şi fixarea complementului.

În fine, capitolele 9 şi 10 urmăresc metabolismul proteinelor şi acizilor nucleici, cu toate implicaţiile în patologie care derivă din asemenea studii, precum şi substanţele şi factorii fizici care interferează cu acesta.

Fiecare capitol are o bibliografie pe probleme, indicînd sursele generale pentru o informare ulterioară.

Condiţiile grafice excelente asigurate de editura W.B. Saunders merită, de asemenea, să fie remarcate.

Cartea este recomandată ca un mijloc valoros de introducere în studiile despre acizi nucleici şi proteine, pentru biologi, fiziologi şi medici, ca şi pentru biochimiştii mai puţin familiarizaţi cu modele animale.

Gheorghe Jebeleanu
Disciplina de biochimie,
I.M.F., Cluj

H. B. BULL, *An Introduction to Physical Biochemistry* (Introducere în biochimia fizică), ed. a 2-a, F. A. Davis Company, Philadelphia U.S.A., 1971, 469 p.

Chimia fizică este recunoscută astăzi ca esenţială pentru toate ramurile chimiei. Obiectul cărţii de faţă îl constituie acele părţi din chimia fizică care prezintă legături cu fenomenele biologice, cu scopul de a da biologului o imagine cît mai utilă, un mod practic de a gîndi şi interpreta rezultatele experimentale.

Cartea cuprinde 16 capitole. Primul este o trecere în revistă a unor noţiuni obligatorii de matematică. Capitolul 2, asupra termodinamicii, prezintă noţiunile de entalpie, lucru mecanic, energie liberă şi metode de evaluare, precum şi aspecte ale bioenergeticii, cum ar fi legăturile macroergice sau transformările de energie chimică în alte forme. Urmează, într-un alt capitol, o prezentare modernă a problemei interacţiunilor ionilor după teoria Debye-Hückel, hidratarea ionilor, structura apei şi semnificaţia acesteia în biologie. Capitolul asupra potenţialelor redox

și asupra acizilor și sistemelor tampon completează noțiunile de electrochimie necesare. Structura biopolimerilor și forțele care o determină sînt discutate într-un capitol aparte, insistîndu-se asupra proteinelor și acizilor nucleici. Două capitole sînt consacrate soluțiilor și fenomenelor optice, prezentîndu-se principii de spectrofotometrie, dispersie rotatorie optică, rezonanță electronică de spin și rezonanță nuclear-magnetică.

Deosebit de reușit apare capitolul asupra fenomenelor interfaciale, domeniu în care autorul a publicat, dealtfel, numeroase studii. Capitolele următoare se ocupă de viscozitatea și curgerea lichidelor, difuziunea și transportul ionilor, electroforeza și potențialul electrocinetic, viteza de sedimentare.

În capitolul 15 se discută mecanismele reacțiilor enzimatice și cinetica lor, iar ultimul capitol tratează studiul elasticității în corelație cu structura gelurilor și a macromoleculelor.

Întreaga lucrare este scrisă în spiritul unei legături imediate cu experimentul, dîndu-se metode de măsurare și interpretare a datelor, rezolvări de probleme și exerciții de calcul. Fiecare capitol are o bibliografie selectivă, ceea ce înlesnește orientarea cititorului în domeniul de interes maxim.

La calitățile de redactare a lucrării se adaugă condițiile grafice remarcabile asigurate de editura F. A. Davis.

Cartea se adresează unui public larg de cercetători biochimiști, biofizicieni, biologi, fiind una din puținele lucrări care pot fi considerate pe drept cuvînt fundamentală.

Gheorghe Jebeleanu
Disciplina de biochimie,
I.M.F., Cluj

LEO MANDELKERN, *An introduction to macromolecules* (Introducere în macromolecule) The English Universities Press Ltd., Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1972, 161 p.

Cartea pune la dispoziția celor interesați în domeniul chimiei, biologiei și fizicii date elementare, detaliate, dar nematematice, cu privire la structura, proprietățile și funcțiile macromoleculelor naturale și de sinteză.

Materialul este sistematizat în șase capitole : se începe cu definiția, prepararea și clasificarea lanțurilor de polimeri, din care reiese diversitatea structurală a acestor compuși, precum și larga lor arie de proprietăți. În capitolul următor sînt schematizate conformațiile moleculare ale diferitelor lanțuri de polimeri și copolimeri sintetici. În capitolele 3 și 4 se trec în revistă proprietățile structurale ale moleculelor cu lanț lung, precum și proprietățile majore ale sistemelor polimerice și relațiile lor cu structura lanțului, ca de exemplu baza structurală a elasticității cauciucului, structura chimică a sticlei etc. În capitolul 5 se tratează proprietățile mecanice și fizice ale unor polimeri în stare cristalină și ale fibrelor (o clasă specială de polimeri cristalini). Structura și proprietățile macromoleculelor cu rol biologic sînt tratate în capitolul 6 (aminoacizi, polipeptide, proteine fibrilare și globulare, vegetale și animale). În ultima parte a acestui capitol se discută, sub aspect general, acizii nucleici și relația lor cu proteinele. În epilogul inti-

tulat „Macromoleculele şi omul" se citează o serie de realizări pozitive ale biologiei moleculare, cum ar fi posibilitatea de control a bolilor genetice, detectarea şi rectificarea erorilor genetice etc., care, totuşi, pun în faţa omului importante responsabilităţi.

Cartea are o listă bibliografică referitoare la diferite subiecte speciale, este bogat ilustrată cu grafice, scheme, tabele, fotografii. Un index alfabetic de subiecte şi autori completează monografia.

Viorica Elefteresciu
Centrul de biostructură, Bucureşti

Cell membranes. Biological and pathological aspects (Membrane celulare. Aspecte biologice şi patologice), Ed. GOETZ W. RICHTER, DANTE G. SCARPELLI, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1971, 180 p.

Volumul cuprinde lucrările simpozionului din 1970, de la St.Louis, al Societăţii americane de patologie şi bacteriologie. Pentru prima oară lucrările Societăţii sînt reunite într-un volum, prezentul fiind primul dintr-o serie.

Numeroasele descoperiri recente, ca şi subtilitatea cunoştinţelor actuale au întărit în mare măsură speranţele cercetătorilor că majoritatea bolilor vor fi clarificate la nivel subcelular. Organizarea şi funcţiile particulelor subcelulare sînt, într-o mare măsură, determinate de structura şi dispoziţia membranelor care delimitează organitele şi domeniile celulare. În scopul aprofundării cunoştinţelor privitoare la interrelaţia dintre structura membranelor şi patogenie, simpozionul a reunit o serie de teme mai generale.

S-au prezentat, astfel, comunicări despre structura moleculară şi funcţia membranelor celulare (F.S. Sjöstrand), microscopia electronică a membranelor în stare naturală (D.F. Parsons), proprietăţile enzimatice ale fracţiunilor celulare asociate membranei (S. Orrenius, L. Ernster), membrana plasmatică ca model al organizării complexe a structurilor biologice (E. L. Benedetti, D. Delbauffe); relaţia dintre rolul metabolismului energetic şi al schimburilor de apă şi ioni şi patogenia lezării celulare a fost prezentată de B. F. Trump, B. P. Croker, Jr., W. J. Mergner, endocitoza şi sistemul vacuolar de către Z. A. Cohn, iar S. Dales a urmărit implicarea membranelor în ciclul infecţios al virusului Vaccinia. Structura şi proprietăţile glicoproteinelor din membrana eritrocitelor au constituit subiectul comunicării prezentate de V. T. Marchesi, iar modificările biogenezei mitocondriilor de ficat de şobolan, în diferite condiţii experimentale, au fost prezentate de D. G. Scarpelli, M. Chiga, E. Haynes.

Comunicările reunite în această monografie nu lasă nici un dubiu asupra marii diversităţi a problemei analizate. Deşi participanţii au lucrat în domenii foarte diferite, toate articolele reprezintă abordări interdisciplinare.

Cornelia Mihai
Institutul oncologic, Bucureşti

Structure and bonding (Structură şi legare) vol. 11, Editori: J. D. Dunitz, P. Hemmerich, J. A. Ibers, C. K. Jorgensen, J. B. Neilands, Sir Ronald S. Nyholm, D. Reinen, R. J. P. Williams, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1972, 170 p., 58 fig.

Volumul de faţă este cel de al 11-lea al seriei de publicaţii neperiodice intitulată „Structure and bonding", afectată problemelor structurii diferiţilor compuşi biologic-activi şi legării acestora de unii ioni metalici.

Editorii au reunit în acest volum patru articole.

În primul articol, *Chimia complexelor înrudite cu cis-Pt* $(NH_3)_2 Cl_2$ *— un medicament antitumoral* (autori: A. J. Thomson, R. J. P. Williams, S. Reslova), sînt detaliate proprietăţile chimice, fizico-chimice şi fotochimice ale complexelor respective. Autorii insistă asupra interacţiilor complexelor pe bază de platină cu aminoacizii, proteinele şi nucleotidele. Pe temeiul datelor prezentate se încearcă să se contureze mecanismul acţiunii antitumorale a acestor complexe. Ele acţionează ca inhibitori ai sintezei ADN.

Al doilea articol este *Chimia enzimelor care au la bază vitamina* B_{12}, de J. M. Wood, D. G. Brown. Autorii fac o prezentare succintă şi sistematică a vitaminei B_{12} şi a enzimelor cu structură asemănătoare. Dintre acestea sînt prezentate transferaze de grupări metil (metionin-sintetaza, acetat-sintetaza, metan-sintetaza) şi de hidrogen (glutamat-mutaza, metil-malonil-CoA-mutaza, dioldehidraza, gliceroldehidraza, etanolaminamonialiaza etc.). Autorii abordează studiul acestor enzime prin metode de rezonanţă magnetică: rezonanţă electronică de spin şi spectroscopie de rezonanţă magnetică nucleară.

Articolul *„Enzime ce conţin molibden*, semnat de R. C. Bray, J. C. Swann, prezintă, în principal, proprietăţile xantinoxidazei din lapte şi intervenţia molibdenului în reacţia catalizată de enzimă. Alături de aceasta, sînt menţionate şi alte enzime care conţin molibden: xantindehidrogenaza, aldehidoxidaza, sulfitoxidaza, nitratreductaza şi nitrogenaza.

Ultimul articol al cărţii este *Evoluţia biologică a centrilor de legare a fierului* (autor J. B. Neilands). Abordarea acestui subiect este deosebit de interesantă, procurînd un tablou util referitor la repartiţia şi proprietăţile biochimice ale compuşilor ce conţin fier. Sînt prezentate, astfel, rolul fiziologic şi proprietăţile biogeochimice ale compuşilor ce conţin fier din organismele protista, plante şi animale.

Fiecare din articolele acestui volum este însoţit de o listă bibliografică bogată, cuprinzînd între 90 şi 146 de indicaţii bibliografice. Formei sistematice de prezentare a problemelor i se adaugă aspectul grafic remarcabil al cărţii. Volumul se încheie cu un index, însumînd — în ordinea alfabetică a autorilor — articolele publicate în cele 11 volume ale colecţiei.

Prin tematica abordată, volumul de faţă reprezintă o punte de legătură între cercetările chimiştilor anorganicieni şi organicieni şi ale biochimiştilor.

Doina Popov
Centrul de biostructură, Bucureşti

H. ELLENBERG, *Ökosystemforschung. Ergebnisse von Symposien der Deutschen Botanischen Gesellschaft und der Gesellschaft für Angewandte Botanik in Innsbruck, Juli 1971* (Cercetarea ecosistemelor. Rezultatele Simpozionului Societății germane de botanică și al Societății de botanică aplicată, Innsbruck, iulie 1971), Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1973, 280 p., 101 fig.

Apariția acestui volum constituie un eveniment în cercetarea științelor naturii, aducînd în atenția noastră, într-un mod documentat și sistematic, cîteva din principalele tipuri de ecosisteme care există pe planeta noastră. Conlucrarea specialiștilor din diferitele ramuri ale biologiei (zoologie, botanică, microbiologie, biologie marină etc.) contribuie la caracterizarea completă și multilaterală a ecosistemelor prezentate. Acestea sînt privite din două puncte de vedere : pe de o parte, echilibrul componenților ecosistemelor și posibilitățile de reglare a acestuia, și, pe de altă parte, rolul omului ca beneficiar, stimulator sau perturbator al echilibrului ecosistemelor cercetate.

Materialul prezentat este sistematizat în 7 secțiuni. Introducerea (H. Ellenberg) precizează obiectul cărții și principalele direcții în investigarea actuală a ecosistemelor. În următoarele secțiuni sînt prezentate ecosisteme tipice : lacuri alpine, lacuri de stepă, ecosisteme marine, ecosisteme terestre, ecosisteme alpine. Menționăm cîteva din articolele încadrate în aceste secțiuni : *Măsurători ale schimbului de gaze la Utricularia vulgaris* (G. Draxler), *Bacteriile în ciclul azotului din mare* (G. Rheinheimer), *Circulația energiei biologice în ecosistemele terestre, sub influența omului* (M. Runge), *Analiza bioelementelor din ecosistemele de pădure* (B. Ulrich, R. Mayer).

Volumul este întregit cu un ultim capitol, *Încercare de clasificare a ecosistemelor din puncte de vedere funcționale* (H. Ellenberg), ce apare ca o concluzie generală a eforturilor de cunoaștere a legităților și factorilor ce determină echilibrul ecosistemelor pe pămînt. Sînt prezentate unele perspective în cercetarea ecosistemelor.

Fiecare din cele 7 secțiuni ale cărții este completată de o listă bibliografică valoroasă, cuprinzînd și titlul articolelor. Accesibilitatea volumului este ușurată de indicele de subiecte care încheie această lucrare deosebit de actuală.

Doina Popov
Centrul de biostructură, București

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca: Viaţa ştiinţifică, în care prin note scurte sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei: congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc., Recenzii, în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie: str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 63, sectorul 1.

1974 JAN

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

M. ŞERBAN şi D. COTARIU, **Biochimia contracţiei musculare**, 1970, 240 p., 20,50 lei.

I. DICULESCU, DOINA ONICESCU şi LETIŢIA MISCHIU, **Biologie celulară**, 1971, 420 p., 36 lei.

N. SĂLĂGEANU, **Fotosinteza**, 1972, 243 p., 5 pl., 13 lei.

V. D. MÂRZA şi H. ARAŢEI, **Biomorfologia corticalei ovariene la mamifere**, 1972, 180 p., 2 pl., 8 lei.

P. RAICU, M. IONESCU-VARO, G. GANCEVICI şi GABRIELA MOISESCU, **Celula. Structură, ultrastructură şi funcţii**, 1972, 344 p., 12 pl., 26 lei.

EUGEN MACOVSCHI, **Natura şi structura materiei vii**, 1972, 184 p., 4 pl., 15 lei.

I. V. DACIUC, **Reglarea celulară a metabolismului glucozei şi acizilor graşi**, 1973, 255 p., 10,50 lei.

La revue „Studii şi cercetări de biochimie" paraît 4 fois par an. Le prix d'un abonnement annuel est de $ 5 —. Toute commande à l'étranger sera adressée à Întreprinderea Rompresfilatelia, Boîte postale 2001, telex 011631, Bucarest, Roumanie, ou à ses représentants à l'étranger. En Roumanie, vous pourrez vous abonner par les bureaux de poste ou chez votre facteur.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 16, NR. 4, P. 345—450, BUCUREŞTI, DECEMBRIE, 1973

I. P. „Informaţia" — c. 3320

43316

Lei 20.—